



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma  
de Barcelona**



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

ESCOLA D'ENGINYERIA

DEPARTAMENT D'ENGINYERIA QUÍMICA, BIOLÒGICA I AMBIENTAL

GRUP D'ENGINYERIA CEL·LULAR I BIOPROCESSOS

PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOTECNOLOGIA

## **Desarrollo de procesos de producción de proteínas bioterapéuticas:**

**Aumento de la productividad específica en células  
HEK293**

Tesis doctoral para la obtención del grado de Doctor en Biotecnología por la  
Universitat Autònoma de Barcelona, dirigida por el Dr. Antoni Casablanca Mira,  
el Dr. Martí Lecina Veciana y el Prof. Dr. Jordi J. Cairó Badillo

**Ramón Román Roldán**

Julio 2018



JORDI JOAN CAIRÓ BADILLO, professor titular del Departament d'Enginyeria Química de la Universitat Autònoma de Barcelona, ANTONI CASABLANCAS MIRA, Tècnic superior de suport a la recerca de la Universitat Autònoma de Barcelona i MARTI LECINA VECIANA, Professor ajudant doctor en el Institut Químic de Sarrià de la Universitat Ramon Llull

CERTIFIQUEM:

Que el llicenciat Ramón Román Roldán ha dut a terme sota la nostra direcció, en els laboratoris del Departament d'Enginyeria Química, Biològica i Ambiental de la Universitat Autònoma de Barcelona, el treball que, amb el títol de ***Desarrollo de procesos de producción de proteínas bioterapéuticas: Aumento de la productividad específica en células HEK293***, es presenta en aquesta memòria, la qual constitueix la seva Tesi per optar al grau de Doctor.

I perquè en prengueu coneixement i tingui els efectes que corresponguin, presentem davant de l'Escola de Doctorat de la Universitat Autònoma de Barcelona l'esmentada Tesi signant aquesta certificació a

Bellaterra, Abril de 2018

Jordi Joan Cairó Badillo    Martí Lecina Veciana    Antoni Casablanças Mira



# INDICE



# INDICE

RESUMEN.....	2
SUMMARY .....	4
NOMENCLATURA .....	6
1.INTRODUCCIÓN.....	8
<b>1.1Biológicos, moléculas biofarmacéuticas y proteínas terapéuticas.....</b>	<b>8</b>
1.1.1 Importancia médica: De la Química a la Biología .....	9
1.1.2 Tipos de moléculas y aplicaciones.....	11
1.1.3 Mercado y regulación .....	12
<b>1.2 Producción biotecnológica de moléculas bioterapéuticas. ....</b>	<b>16</b>
1.2.1 Sistemas de producción .....	16
1.2.2 Expresión en líneas celulares de mamífero .....	20
1.2.3 Características de los procesos de producción .....	23
<b>1.3 Caso de estudio. Aumento de la producción específica de biológicos en células humanas .....</b>	<b>26</b>
1.3.1. Importancia de la producción volumétrica en los procesos .....	26
1.3.2. Selección de la célula hospedadora: La célula HEK293.....	28
1.3.3. Proteínas modelo: eGFP, Interferón gamma y Trastuzumab .....	30
<b>1.4    Referencias .....</b>	<b>32</b>
2.OBJETIVOS.....	40
3.RESULTADOS (I): CONSTRUCCION DE LINEAS CELULARES PRODUCTORAS de IFN $\gamma$ y Trastuzumab .....	42
<b>3.1 Introducción .....</b>	<b>42</b>
<b>3.2 Obtención de las secuencias codificantes.....</b>	<b>45</b>
3.2.1 IFN $\gamma$ .....	45
3.2.2. Trastuzumab .....	46
<b>3.3 Expresión de IFN<math>\gamma</math>.....</b>	<b>49</b>
<b>3.4 Expresión de Trastuzumab .....</b>	<b>51</b>
3.4.1. Construcción de sistemas de expresión.....	51
3.4.2. Evaluación de las estrategias de expresión .....	53

<b>3.5 Conclusiones .....</b>	<b>56</b>
<b>3.6 Referencias.....</b>	<b>56</b>
<b>4.RESULTADOS (II): ELEMENTOS GENÉTICOS OPTIMOS PARA LA EXPRESIÓN Y SECRECIÓN .....</b>	<b>58</b>
<b>4.1. Introducción .....</b>	<b>58</b>
<b>4.2 Promotores.....</b>	<b>59</b>
4.2.1 Expresión de eGFP bajo el control de los diferentes promotores .....	60
<b>4.3 Péptidos señal .....</b>	<b>63</b>
4.2.2. Secreción de eGFP mediante el uso de diferentes péptidos señal .....	65
<b>4.4 Aplicación del péptido señal SPIFNA en la producción de IFN<math>\gamma</math> y Trastuzumab .....</b>	<b>68</b>
<b>4.5 Conclusiones .....</b>	<b>70</b>
<b>4.6 Referencias.....</b>	<b>72</b>
<b>5. RESULTADOS (III): DESARROLLO DE MARCADORES DE SELECCION METABOLICOS PARA LA LINEA HEK293.....</b>	<b>74</b>
<b>5.1 Introducción .....</b>	<b>74</b>
<b>5.2 Obtención de líneas celulares auxotróficas .....</b>	<b>78</b>
5.2.1. Auxotrofias naturales .....	78
5.2.2. Auxotrofias generadas artificialmente mediante CRISPR/Cas9 .....	83
<b>5.3 Eficiencia selectiva y productividad de los diferentes marcadores de selección .....</b>	<b>91</b>
5.3.1. Eficiencia de los marcadores de selección .....	91
5.3.2. Productividad específica de cada sistema .....	93
5.3.3. Caracterización comparativa del crecimiento y de la producción volumétrica .....	95
5.3.4 Aumento de la producción específica mediante la utilización de inhibidores .....	97
<b>5.4 Producción de IFN<math>\gamma</math> y Trastuzumab utilizando como marcador de selección la glutamina sintetasa (GS) .....</b>	<b>98</b>
5.4.1. Construcción de líneas productoras usando GS y aumento de la expresión mediante MSX .....	98
<b>5.5 Conclusiones .....</b>	<b>100</b>
<b>5.6 Referencias.....</b>	<b>103</b>

6. RESULTADOS (IV): INTEGRACIÓN DIRIGIDA DE LOS GENES DE INTERÉS MEDIANTE TECNICAS DE EDICION GENÓMICA: .....	108
<b>6.1 Introducción .....</b>	<b>108</b>
<b>6.2 Construcción y caracterización de la línea celular hospedadora. ....</b>	<b>114</b>
6.2.1. Selección clonal .....	114
6.2.2. Caracterización del lugar de integración. ....	116
<b>6.3 Integración dirigida de moléculas de interés .....</b>	<b>119</b>
6.3.1. Arquitectura de los vectores. ....	119
6.3.2. Comparativa de estrategias de integración.....	121
6.3.3. Aislamiento clonal y comprobación de la especificidad de la integración .....	122
6.3.4. Efecto de la integración dirigida en la producción específica de los productos problema .....	124
<b>6.4. Conclusiones .....</b>	<b>126</b>
<b>6.5 Referencias.....</b>	<b>128</b>
7. RESULTADOS (V): EFECTO DEL CO <sub>2</sub> en LA PRODUCCIÓN de IFN $\gamma$ en bioreactor.....	132
<b>7.1 Introducción .....</b>	<b>132</b>
<b>7.2 Resultados.....</b>	<b>133</b>
7.2.1. Cultivo de HEK293_IFN $\gamma$ en procesos en batch en biorreactor de 2L y matraz agitado en condiciones de pH controlado. ....	133
7.2.2. Cultivo de HEK293_IFN $\gamma$ en procesos en batch en biorreactor de 2L y matraz agitado en condiciones de pH libre. ....	135
7.2.3. Cultivo de HEK293_IFN $\gamma$ en procesos en batch en biorreactor de 2L y matraz agitado en condiciones de pH libre y con una corriente de CO <sub>2</sub> al 1%.....	137
<b>7.3 Conclusiones .....</b>	<b>140</b>
<b>7.4 Referencias.....</b>	<b>142</b>
8. CONCLUSIONES GENERALES .....	144
<b>8.1 Referencias.....</b>	<b>150</b>
9. MATERIALES Y METODOS.....	154
<b>9.1 Material biológico .....</b>	<b>154</b>
9.1.1 Líneas celulares .....	154

9.1.2 Cepas bacterianas.....	155
<b>9.2 Medios de cultivo.....</b>	<b>155</b>
9.2.1 Medio de cultivo para la línea celular HEK293.....	155
9.2.2- Medio de cultivo para la cepa bacteriana .....	158
<b>9.3 Mantenimiento y comprobación del material biológico.....</b>	<b>159</b>
9.3.1 Mantenimiento de las líneas celulares HEK293 .....	159
9.3.2 Comprobación de contaminación por <i>Mycoplasma spp.</i> en las líneas celulares HEK293.....	160
9.3.3 Mantenimiento de la cepa bacteriana.....	161
<b>9.4 Sistemas de cultivo .....</b>	<b>161</b>
9.4.1 Sistemas de cultivo para células animales .....	161
9.4.2 Sistemas de cultivo de la cepa bacteriana .....	168
<b>9.5 Análisis de los cultivos celulares .....</b>	<b>168</b>
9.5.1 Determinación del recuento y la viabilidad celular.....	168
9.5.2 Determinación de la concentración de glucosa y lactato .....	170
9.5.3 Determinación de la eficacia de transfección mediante microscopia de fluorescencia.....	171
9.5.4 Análisis de poblaciones celulares mediante citometría de flujo .....	172
<b>9.6 Análisis de los productos. ....</b>	<b>175</b>
9.6.1 Determinación de la concentración de interferón gamma.....	175
9.6.2 Determinación de la concentración de trastuzumab.....	177
9.6.4 Electroforesis de proteínas mediante SDS-PAGE .....	179
<b>9.7 Vectores plasmídicos.....</b>	<b>181</b>
9.7.1 Vectores base .....	181
9.7.2 Vectores derivados de pIRESpuro3 .....	184
9.7.3 Vectores de expresión construidos en el trabajo de tesis .....	189
<b>9.8 Técnicas de Biología molecular.....</b>	<b>190</b>
9.8.1 Extracción y purificación de DNA plasmídico .....	190
9.8.2 Extracción y purificación de DNA genómico.....	191
9.8.3 Extracción de RNA total.....	192
9.8.4 Purificación y separación del material genético.....	193
9.8.5 Cuantificación de la concentración de DNA mediante espectrofotometría. ....	196

9.8.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	197
9.8.7 Modificaciones enzimáticas del DNA .....	202
9.8.8. Introducción de material genético en organismos.....	205
<b>9.9 Otros métodos.....</b>	<b>207</b>
9.9.1 Cálculo del número de copias de un transgen mediante PCR cuantitativa.....	207
9.9.2 Determinación del punto de integración de un transgen mediante PCR inversa.....	209
9.9.3 Edición genómica de líneas celulares mediante CRISPR/Cas9 y aislamiento clonal mediante <i>Cell-Sorting</i> .....	210
<b>9.10 Referencias.....</b>	<b>212</b>
10. ANEXOS.....	213
<b>10.1 ANEXO I: Secuencias de DNA usadas en el presente trabajo .....</b>	<b>213</b>
<b>10.2 ANEXO II. Oligonucleótidos usados en el presente trabajo .....</b>	<b>217</b>



## RESUMEN

La presente tesis doctoral está focalizada en la producción de proteínas recombinantes de interés bioterapéutico mediante el cultivo de células de mamífero. En concreto, el trabajo realizado ha consistido en la obtención, mediante ingeniería genética, de células de riñón embrionario humano (HEK293) productoras de dos proteínas bioterapéuticas candidatas, la citoquina interferón gamma y el anticuerpo monoclonal terapéutico trastuzumab. El objetivo principal del trabajo ha sido la mejora genética de las líneas celulares obtenidas, con el fin de aumentar la productividad específica de las mismas.

Durante el desarrollo del trabajo, se han usado diversas aproximaciones con el fin de conseguir este objetivo. En primer lugar, durante el capítulo 3 se ha realizado la construcción de las células productoras, comprobando que expresan los productos de interés y poniendo a punto las diversas técnicas necesarias para su cultivo. Posteriormente, en el capítulo 4 se han evaluado diferentes elementos genéticos que regulan la expresión y la secreción de las proteínas recombinantes (Promotores y péptidos señal), encontrándose como elementos óptimos el promotor CMV y el péptido señal del interferón alfa-2. Con estos elementos se ha conseguido multiplicar por 5 la producción específica del anticuerpo monoclonal trastuzumab.

En el capítulo 5, se ha explorado un elemento genético de gran importancia para la obtención de líneas celulares recombinantes, el marcador de selección basado en genes metabólicos. Estos marcadores son ampliamente usados en la industria de manufactura de bioterapéuticos, con el fin de seleccionar las células más productoras dentro de una población determinada sin necesidad de usar antibióticos para ello. Sin embargo, su aplicación en células HEK293 se ve dificultada por la presencia en las mismas de enzimas endógenas que interfieren con los marcadores comercialmente disponibles. Los resultados obtenidos durante este capítulo han permitido la definición de 2 marcadores de selección, uno basado en la enzima fenilalanina hidroxilasa, aplicable a las células HEK293

convencionales y otro basado en la glutamina sintetasa, aplicado a células HEK293 mutantes obtenidas mediante edición genómica con el sistema CRISP/Cas9. El uso de este último marcador, en combinación con un inhibidor, ha permitido una mejora de entre 3 y 5 veces en la producción de interferón gamma y de trastuzumab, en comparación con el marcador basado en resistencia a antibióticos.

Durante el capítulo 6, se ha explorado y desarrollado un método para integrar en el genoma de la célula HEK293, de forma dirigida, el vector que contienen el gen que codifica para las proteínas de interés. Para ello, se ha construido y caracterizado un sitio genómico de alta transcripción mediante el uso de la proteína verde fluorescente (eGFP), para, posteriormente, integrar en dicho lugar el constructo de interés usando el sistema CRISPR/Cas9. Los resultados obtenidos en este capítulo demuestran que la técnica ensayada permite la integración dirigida en el punto deseado del ADN genómico de la célula hospedadora, habiéndose logrado duplicar la producción específica de interferón gamma y aumentando la producción de trastuzumab en un 30%.

Finalmente, durante el capítulo 7 se ha llevado a cabo un estudio de escalado en la producción de interferón gamma usando biorreactores como paso previo a una potencial aplicación industrial. Se ha realizado un completo análisis de las condiciones fisiológicas de cultivo en biorreactor, habiendo sido necesario optimizar la concentración de CO<sub>2</sub> y el pH con el fin de conseguir un proceso escalable desde el cultivo en matraz agitado hasta el biorreactor y demostrando que las células HEK293 cultivadas en biorreactor necesitan una mínima cantidad de CO<sub>2</sub> para conseguir un metabolismo óptimo y mantener la productividad específica. El proceso resultante ha sido escalado con éxito usando un reactor preindustrial de un solo uso de 50L.

Se puede concluir que, a tenor de los resultados obtenidos y, dada la variedad de modelos ensayados, las técnicas desarrolladas resultan interesantes de cara a una posible aplicación en la producción de diferentes proteínas recombinantes de interés bioterapéutico, sector de gran importancia económica e industrial.

## SUMMARY

The thesis is focused on the production of recombinant proteins of biotherapeutic interest using mammalian cell culture. During the work, several human embryonic kidney-based (HEK293) cells lines has been developed, applying genetic engineering techniques, to produce two candidate biotherapeutics: the cytokine Interferon gamma and the monoclonal antibody Trastuzumab. The main goal of the work has been the genetic improvement of the cell lines obtained, in order to increase the specific productivity of the candidates.

Throughout the work, diverse approaches have been used to achieve this goal. Firstly, during the third chapter, development of productive cells was carried out, checking correct expression of products of interest and good practice of cell culture techniques. Afterwards, in chapter 4, different genetic elements regulating the expression and secretion of recombinant proteins (Promoters and signal peptides) were evaluated, finding CMV promoter and interferon alpha-2 signal peptide being the optimal elements. By using these elements, a 5-fold increase in specific productivity of trastuzumab expressing cells has been achieved.

In Chapter 5, the metabolic selectable marker, a key genetic element in cell line development, has been explored. These markers are widely used in the biotherapeutics manufacturing industry, in order to select the most productive cells within a given population avoiding the use of antibiotics. However, its application in HEK293 cells is hampered by the expression of endogenous genes that interfere with commercially available markers. The results obtained during this chapter have allowed the definition of 2 selectable markers, one based on the enzyme phenylalanine hydroxylase, applicable to conventional HEK293 cells and another based on glutamine synthetase, applied to mutant HEK293 cells obtained by gene editing using CRISP/Cas9 technology. The use of glutamine synthetase, in combination with an inhibitor, has elicited a 3 to 5-fold increase in trastuzumab and interferon gamma production, in comparison with antibiotic resistance marker

During Chapter 6, a targeted- integration method has been explored and developed to insert the vector containing the gene of interest into a particular location into HEK293 genome. To this purpose, a high transcription genomic site has been characterized using green fluorescent protein (eGFP), in order to integrate the construct of interest via CRISPR/Cas9. The technique developed in this chapter allows targeted-integration of transgenes into the expected site of genomic DNA of the host cell, doubling the specific production of interferon gamma and increasing the production of trastuzumab by a 30%.

Finally, during chapter 7, we carried out a scale-up study on interferon gamma production using bioreactors, as previous step towards a potential industrial application. A complete analysis of the physiological conditions of culture in bioreactor has been conducted, being necessary an optimization of CO<sub>2</sub> feeding and pH levels in order to achieve a scalable process from the shake flask to the bioreactor. These findings prove that HEK293 cells cultured in bioreactor need a minimum amount of CO<sub>2</sub> to achieve an optimal metabolism, while maintaining specific productivity. The productive process has been successfully tested at pilot scale using a 50L single use bioreactor.

It can be stated that, based on the results obtained and given the variety of models tested, the methods developed are potentially applicable to the production of different recombinant proteins of biotherapeutic interest, a sector of great economic and industrial significance.

# NOMENCLATURA

<b>CAG</b>	Promotor de B-actina de pollo con <i>enhancer</i> del promotor CMV
<b>Cas9</b>	<i>CRISPR associated protein 9</i> , proteína asociada a CRISPR 9
<b>CHO</b>	Células de ovario de hamster chino
<b>CMV</b>	Promotor del cytomegalovirus humano
<b>CRISPR</b>	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
<b>DFBS</b>	<i>Dialyzed Fetal Bovine Serum</i> , Suero fetal bovino dializado.
<b>DHFR</b>	Dihidrofolato reductasa
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>EF-1<math>\alpha</math></b>	Promotor del factor de elongacion 1- $\alpha$ humano
<b>eGFP</b>	<i>enhanced Green Fluorescent Protein</i> , Proteína verde fluorescente
<b>EMA</b>	<i>European Medicines Agency</i> , Agencia europea del medicamento
<b>FACS</b>	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> , Separación celular activada por fluorescencia
<b>FBS</b>	<i>Fetal Bovine Serum</i> , Suero fetal bovino
<b>FDA</b>	<i>Food and Drugs Administration</i> , Administración de alimentos y medicamentos
<b>GAU</b>	Luciferasa de <i>Gaussia Princeps</i>
<b>GLUL</b>	Glutamina-amonio liasa (gen de la glutamina sintetasa)
<b>GS</b>	Glutamina sintetasa
<b>GSEM</b>	<i>Glutamine synthetase expression medium</i>
<b>HDR</b>	<i>Homology-directed repair</i> , Reparación mediada por homología
<b>HEK293</b>	Células embrionarias de riñón humano, 293.
<b>IFN<math>\alpha</math>2</b>	Interferón Alfa 2
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma humano
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IL-2</b>	Interleucina-2
<b>IRES</b>	<i>Internal Ribosome Entry Site</i> , Sitio interno de entrada al ribosoma
<b>IVS</b>	<i>Intervening sequence synthetic intron</i> ; Intrón sintético
<b>mAb</b>	<i>Monoclonal antibody</i> , anticuerpo monoclonal
<b>MCS</b>	<i>Multiple Cloning Site</i> ; sitio múltiple de clonación.
<b>MDC</b>	Maxima densidad celular
<b>MHA</b>	Brazo de microhomología
<b>MMEJ</b>	<i>Microhomology-mediated end joining</i> , Recombinacion mediada por microhomología
<b>MSX</b>	Metionina-sulfoximina
<b>NHEJ</b>	<i>Non-homologous end joining</i> , Recombinación no homóloga
<b>NOSP</b>	Sin péptido señal
<b>pac</b>	Puomicin-acetiltransferasa, gen de resistencia a la puomicina
<b>PAH</b>	Fenilalanina hidroxilasa
<b>p-CPA</b>	p-clorofenilalanina
<b>RMCE</b>	<i>Recombinase-mediated cassette exchange</i> , intercambio de cassette mediado por recombinasa
<b>SP</b>	Péptido señal
<b>TALLEN</b>	<i>Transcription activator-like effector nucleases</i>
<b>TYMS</b>	Timidilato sintasa
<b>ZFN</b>	<i>Zinc-finger protein</i>



# CAPITULO 1

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Biológicos, moléculas biofarmacéuticas y proteínas terapéuticas

Las moléculas biofarmacéuticas, también conocidas como moléculas bioterapéuticas, son una clase de moléculas con actividad terapéutica dentro del grupo de los “productos biológicos”.

Según la FDA, los productos biológicos, a su vez, son grupo heterogéneo de principios con actividad terapéutica que comprenden tipos tan diferentes como las vacunas, la sangre y los hemoderivados, las terapias genéticas, las terapias con células madre y tisulares, las moléculas biofarmacéuticas mencionadas anteriormente y otros, caracterizándose todos ellos por ser aislados a partir de organismos vivos, ya sea directamente o mediante producción biotecnológica<sup>1</sup>

Las definiciones y aspectos semánticos que separan o engloban a los diversos grupos de biológicos son, aun hoy, materia de debate entre los expertos y las agencias regulatorias, y pueden variar según el contexto de uso del producto. Dentro del sector, tanto la Organización Mundial de la Salud (WHO) como algunos expertos diferencian entre *Biologics* (Todos los productos bioterapéuticos) y *Biologicals* (Relacionado con aquellos biológicos obtenidos mediante la tecnología del DNA recombinante).<sup>2</sup>

Estos últimos, a diferencia del resto de biológicos (Que pueden ser desde células completas a productos complejos como los hemoderivados), están compuestos por entidades moleculares (Principalmente proteínas, aunque también existen ácidos nucleicos y azúcares) obtenidas normalmente mediante procesos biotecnológicos. Dentro de estos *Biologicals*, el grupo más importante lo representan las proteínas recombinantes terapéuticas, cuyo proceso de obtención será el sujeto de estudio del presente trabajo.

El término “Biológicos” (traducción directa de inglés, *Biologicals*, siendo este a su vez una abreviación del término completo *Biological drugs*) puede dar lugar a

confusión, ya que también se ha venido empleando en la industria y en investigación para nombrar exclusivamente a las proteínas recombinantes terapéuticas<sup>3</sup>, con el fin de resaltar la diferencia existente entre estos y los medicamentos tradicionales basados en síntesis química. A lo largo de este apartado y los subsiguientes se efectuará un repaso de las características de estas moléculas, con especial énfasis a los aspectos históricos, regulatorios y científicos.

### **1.1.1 Importancia médica: De la Química a la Biología**

El uso de productos biológicos con efecto terapéutico es tan antiguo como la misma humanidad y su utilización se ha llevado a cabo a lo largo de toda la historia, desde la medicina tradicional y los remedios vegetales, hasta los modernos antibióticos y otras moléculas terapéuticas obtenidas mediante la fermentación microbiana. Sin embargo, el uso de moléculas bioterapéuticas complejas, tales como las proteínas, es mucho más reciente. Las primeras proteínas usadas como agentes terapéuticos fueron la insulina, aislada del páncreas de animales durante la segunda década del siglo XX<sup>4</sup> y la hormona del crecimiento humana (hGH), obtenida a partir de glándulas pituitarias de cadáveres humanos<sup>5</sup>. Sin embargo, el uso de fuentes animales para la fabricación de estas y otras proteínas bioterapéuticas imponía un límite práctico a la cantidad de producto que se podía obtener, así como un riesgo de contaminación con productos animales o incluso la transmisión de enfermedades, como se demostró con el caso de la Enfermedad de Creutzfeld-Jakob, producida por un prion que contaminaba las preparaciones de hGH.

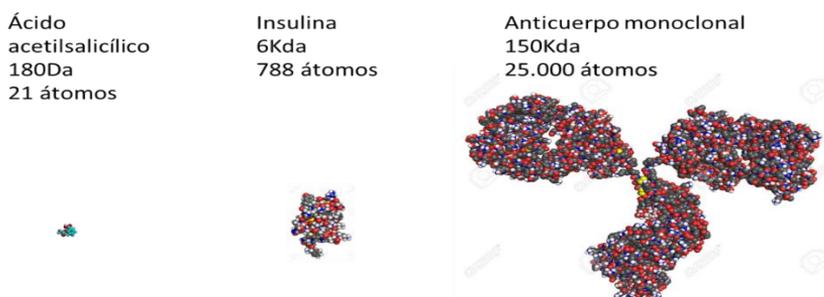
El desarrollo de la tecnología del DNA recombinante permitió obtener cantidades significativas de proteínas bioterapéuticas y alejó el peligro de contaminaciones no deseadas, comenzado por las mismas moléculas ya usadas previamente. Así, la insulina recombinante de Genentech fue aprobada en 1982<sup>6</sup>, seguida por la hormona del crecimiento recombinante (rhGH) en 1985<sup>7</sup>. En la actualidad, existen 239 proteínas o péptidos bioterapéuticos aprobados por la FDA<sup>8</sup>

El uso de proteínas recombinantes representó un fuerte impacto y un gran aumento en las capacidades terapéuticas de la medicina, en una época en la que la

práctica totalidad de los tratamientos médicos se realizaban con moléculas tradicionales de síntesis química. Las proteínas bioterapéuticas presentan ventajas de diversa índole sobre las moléculas químicas convencionales, como señalan Leader et al<sup>9</sup>: Sus características estructurales inherentes les proveen de funciones altamente específicas, que no pueden ser realizadas por compuestos químicos más simples. Esta especificidad, además, reduce el riesgo de reacciones adversas o no deseadas. Además, debido a que la mayoría de proteínas son producidas de manera natural por el cuerpo humano, son generalmente bien toleradas. Cualquier enfermedad en la que un determinado gen esté mutado o no pueda producir la proteína codificada, puede ser tratada con proteínas exógenas mediante una terapia de reemplazo, siendo improbable conseguir el mismo efecto con compuestos químicos tradicionales.

Las diferencias estructurales que explican las diferencias apuntadas entre los compuestos químicos tradicionales y las proteínas bioterapéuticas son claramente visibles en el esquema como el de la Figura 1.

El uso de las proteínas terapéuticas ha supuesto una verdadera revolución en varios campos de la medicina, permitiendo el tratamiento de enfermedades de alta incidencia y mortalidad que, en muchos casos, no habían tenido tratamiento alguno, como la diabetes, la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, diversos linfomas y todo tipo de cánceres<sup>10</sup>.



**Figura 1.1. Comparación de la estructura y complejidad entre un fármaco tradicional (Ácido acetilsalicílico, AAS) y dos proteínas bioterapéuticas (Insulina y un anticuerpo monoclonal)**

### 1.1.2 Tipos de moléculas y aplicaciones.

Como se ha comentado anteriormente, el término “biológicos” hace referencia a una clase de productos terapéuticos, mayoritariamente proteínas, que son producidos mediante medios biológicos usando tecnología del DNA recombinante. Los biológicos se clasifican normalmente atendiendo a su función, en los tipos que se pueden observar en la tabla 1:

**Tabla 1: Clasificación de los Biológicos**

<b>Tipo</b>	<b>Ejemplos</b>
<b>Factores sanguíneos</b>	Factor VIII, Factor IX, activador del plasminógeno tisular (tPA)
<b>Factores de crecimiento</b>	Eritropoyetina, G-CSF
<b>Hormonas</b>	Insulina, hormona de crecimiento humana (hGH), Glucagón
<b>Citoquinas</b>	Interferones, Interleuquinas, TNF- $\alpha$
<b>Anticuerpos monoclonales</b>	Rituximab, Trastuzumab, Infliximab
<b>Vacunas</b>	Hepatitis B
<b>Enzimas terapéuticas</b>	Asparaginasa, Lisozima, Uricasa

Cada grupo tiene diferentes aplicaciones. Los Factores sanguíneos se utilizan para el tratamiento de diversas enfermedades de la sangre, como la hemofilia (Factor VIII<sup>11</sup>) o las trombosis (tPA<sup>12</sup>). Los Factores de crecimiento de células sanguíneas, como la Eritropoyetina o G-CSF, se han venido usando para el tratamiento de anemias y otras enfermedades o situaciones clínicas en las que sea necesario aumentar el conteo de determinadas células sanguíneas<sup>13</sup>.

Las hormonas recombinantes se usan en toda clase de terapias de sustitución hormonal (hGH o Gonadotropina) para aquellos afectados de enfermedades en las cuales la persona no produce la cantidad necesaria de una determinada hormona<sup>14</sup>. El tratamiento de la diabetes mellitus mediante insulina recombinante es un ejemplo clásico<sup>15</sup>. Varias citoquinas se usan en tratamientos contra diferentes enfermedades, como la trombocitopenia (IL-11<sup>16</sup>), la enfermedad

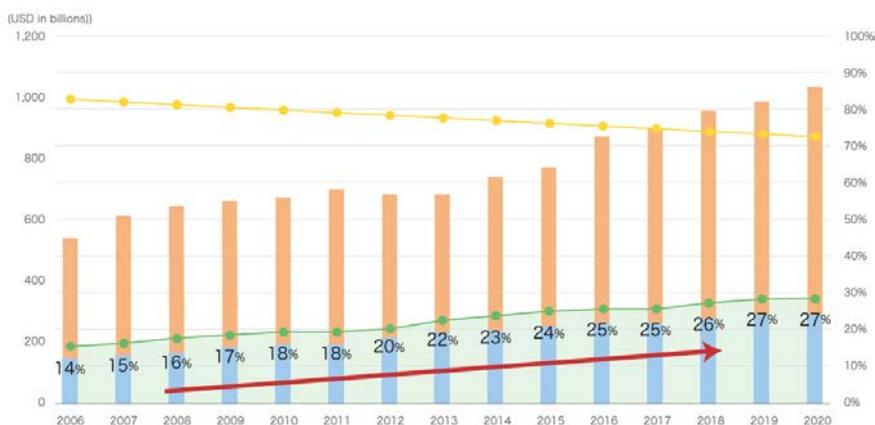
granulomatosa crónica (IFN $\gamma$ <sup>17</sup>) o la esclerosis múltiple (IFN $\beta$ <sup>18</sup>). Asimismo, enzimas producidas mediante la tecnología del DNA recombinante se utilizan rutinariamente para el tratamiento de la gota (Uricasa<sup>19</sup>) o la fibrosis quística (DNasa<sup>20</sup>).

Sin embargo, los productos “estrella” entre los biológicos son sin duda los anticuerpos monoclonales (mAbs). Gracias a la alta especificidad para reconocer su antígeno, su versatilidad a la hora de ser modificados química o biológicamente y su generalmente elevada biodisponibilidad, hace que sean decenas los mAbs aprobados para los más diversos tratamientos, como el del linfoma No Hodgking (Rituximab<sup>21</sup>), el cáncer de mama (Trastuzumab<sup>22</sup>), el cáncer de colon (Cetuximab<sup>23</sup>) o la artritis reumatoide (Infliximab<sup>24</sup>).

En su mayoría, todos los biológicos se aplican mediante inyección intravenosa, a partir de preparaciones liofilizadas o líquidas, aunque existen nuevas metodologías de aplicación<sup>25,26</sup>.

### 1.1.3 Mercado y regulación

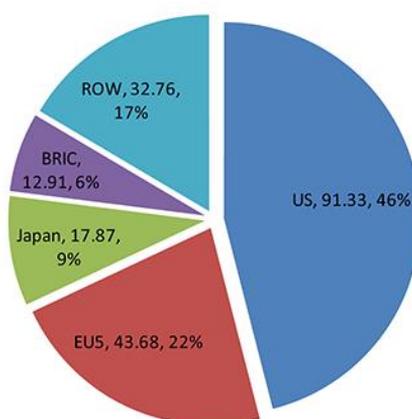
El mercado mundial de los biológicos totalizaba en el año 2016 aproximadamente 228 mil millones de \$<sup>27</sup>, estimándose un crecimiento del 3,9% anual, como se observa en la Figura 1.2<sup>28</sup>.



**Figura 1.2. Previsión de crecimiento del mercado mundial de los biológicos (Azul) y porcentaje del mismo sobre el mercado farmacéutico global (Naranja).**

Segmentado por países y regiones, los EE.UU. representaban en 2014 el 46% del mercado, mientras que Alemania, Italia, Francia, España y el Reino Unido totalizaban un 22% aproximadamente<sup>29</sup>. En la figura 1.3 se puede observar la distribución regional del mercado.

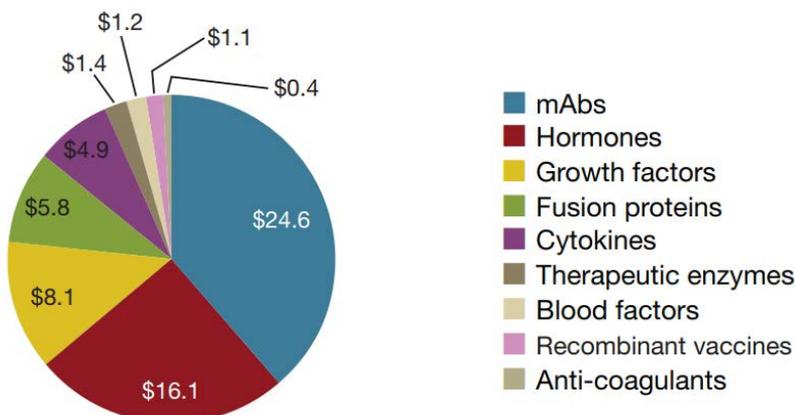
Si dividimos el mercado en función del tipo de biológicos, los anticuerpos monoclonales (mAbs) representan aprox. el 40% de las ventas globales del mercado, seguidos por las hormonas con un 25%, en gran parte gracias al elevado volumen de negocio representado por las ventas de insulina. El 35% restante del mercado se reparte entre los factores de crecimiento, las citoquinas, las proteínas de fusión y otras, como se observa en la figura 1.4<sup>30</sup>



**Figura 1.3. Distribución regional del mercado de biológicos en porcentaje y valor absoluto (en billones de \$), siendo US (Estados Unidos), EU5 (Alemania, Italia, Francia, España y el Reino Unido), BRIC (Brasil, Rusia, India y China) y ROW (Resto de países)**

El proceso de desarrollo, ensayo y comercialización de cualquier molécula biológica está pautado por diferentes agencias regulatorias, en función del país o entidad supranacional correspondiente. La FDA (Food and Drug Administration) norteamericana y la EMA (European Medicine Agency) europea son las más importantes y las referencias a nivel mundial. Otras agencias importantes a nivel mundial, tanto por volumen regulatorio como por la cantidad de personas afectadas, son la PMDA (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, Japón)

la CFDA (Chinese Food and Drug Administration, China) la CDSCO (Central Drugs Standard Control Organization, India) o el Ministerio de sanidad de la Federación Rusa (Minzdrav).



**Figura 1.4. Distribución global de ventas en el mercado de los biológicos segmentada por tipo de producto.**

Tomando como ejemplo la FDA, de gran peso a nivel mundial, el proceso de desarrollo de cualquier fármaco, incluidos los biológicos, es dividido en 5 fases:

1. **Descubrimiento y desarrollo:** Esta es invariablemente la primera fase y, dadas sus características predominantemente científicas y académicas, no es una fase regulada
2. **Investigación preclínica:** Es la primera fase en la que la FDA obliga a testear los posibles efectos tóxicos del fármaco, mediante técnicas In-Vitro e In-Vivo. La FDA requiere que las pruebas se realicen según la normativa BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio)<sup>31</sup>
3. **Investigación clínica:** Estudios llevados en cabo en seres humanos, divididos a su vez en 4 fases en las que se evalúan diferentes parámetros:
  - a. **1:** Seguridad y dosis (Entre 20 y 100 personas)
  - b. **2:** Eficacia y efectos no deseados (Varios cientos de personas)
  - c. **3:** Eficacia y seguimiento secundarios (Entre 300 y 3000 personas)

**d. 4: Eficacia y seguridad (Varios miles de personas)**

- 4. Revisión:** Una vez completadas las anteriores fases, un equipo de la FDA revisa todos los datos acerca de la droga y emite un informe aprobando o rechazando la licencia de comercialización del producto
- 5. Monitorización:** La FDA continúa monitorizando los medicamentos aprobados durante un cierto periodo de tiempo con el fin de vigilar posibles efectos no deseados que no hayan sido descubiertos durante las fases clínicas anteriores.

En lo que respecta a los requisitos de calidad de los productos<sup>32</sup>, las autoridades regulatorias demandan requisitos de calidad diferentes (Normalmente vinculadas a las normas BPF, Buenas prácticas de fabricación) y más completos que los equivalentes para drogas químicas, por varias razones<sup>33</sup>:

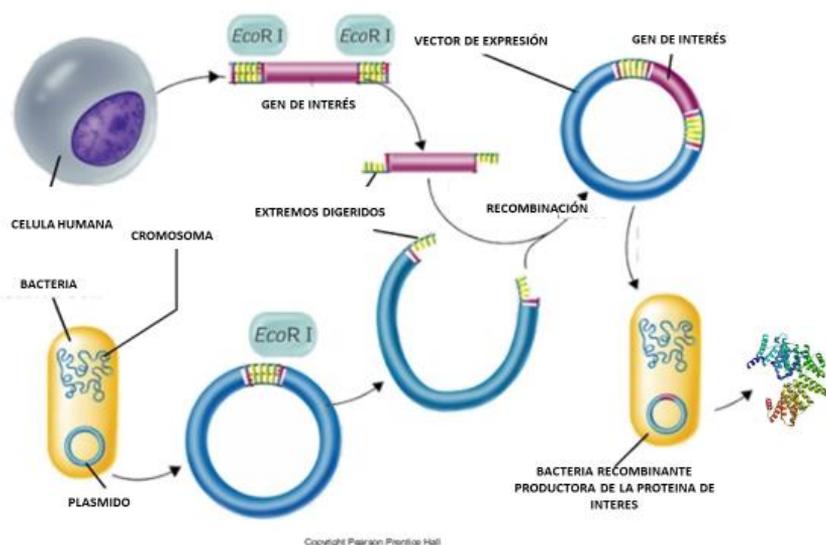
- **Uso de material biológico:** Es necesario mantener viables las células productoras del fármaco de interés, para evitar la contaminación del producto con proteínas y ácidos nucleicos de la célula huésped debido a su muerte prematura. Existen niveles máximos permitidos de proteínas del huésped (HCP's)<sup>34</sup> y DNA<sup>35</sup> en la preparación final. Además, ha de asegurarse que las células no están infectadas con ningún virus o agente infeccioso, aunque luego pudiera ser eliminado en el proceso de purificación<sup>36</sup>.
- **Impacto del proceso de fabricación:** Pequeños cambios en el proceso de fabricación ( $T^a$ <sup>37</sup>,  $pO_2$ <sup>38</sup>,  $pH$ <sup>39</sup>, falta de nutrientes clave,...) puede tener gran impacto en la conformación tridimensional, en modificaciones no deseadas de la secuencia aminoacídica o en diferencias en la glicosilación, todo lo cual puede afectar gravemente la funcionalidad del producto. Las agencias regulatorias controlaran la reproducibilidad de estos aspectos durante proceso de fabricación mediante la exigencia de certificación y registro de los datos específicos al proceso<sup>40</sup>.
- **Complejidad del producto:** Debido a la compleja estructura de los biológicos (ver figura 1), las agencias regulatorias exigen diversos test que garantizan, aparte de lo anteriormente mencionado, la identidad

peptídica del biológico mediante un mapeo peptídico, análisis de aminoácidos, Isoelectroenfoques, etc...<sup>41</sup>

## 1.2 Producción biotecnológica de moléculas bioterapéuticas.

### 1.2.1 Sistemas de producción

Actualmente, existen moléculas bioterapéuticas fabricadas en diversos tipos de organismos hospedadores. Mayoritariamente, todos se manufacturan tras la correspondiente manipulación genética del organismo hospedador usando tecnología del DNA recombinante<sup>42</sup>. De manera resumida, es necesario obtener el material codificante de la proteína, construir un vector adaptado al organismo hospedador elegido, que contenga los elementos genéticos adecuados para la expresión del gen de interés (GOI), amén de otros elementos necesarios (Marcadores de selección, origen de replicación, etc..). La construcción genética ha de introducirse en el organismo usando diferentes técnicas<sup>43-47</sup> y, posteriormente, ha de aislarse el organismo productor. La figura 1.5 muestra un ejemplo simplificado de producción en hospedadores bacterianos.



**Figura 1.5: Ejemplo de tecnología del DNA recombinante aplicada a la obtención de bacterias productoras de una proteína recombinante de origen humano**

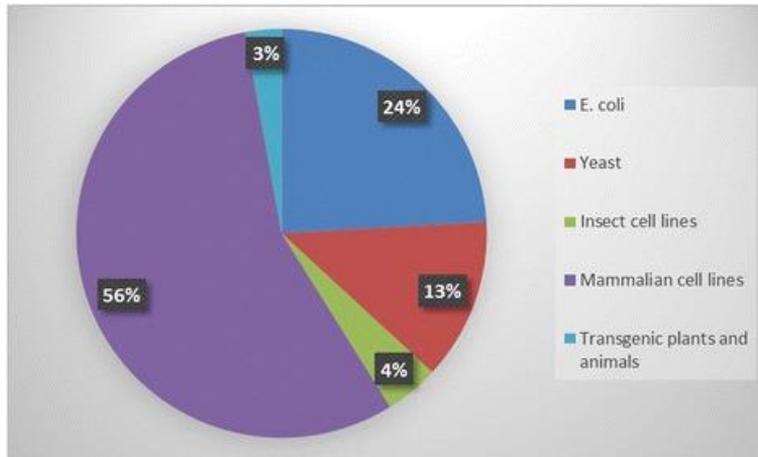
Los sistemas más usados para la producción de biológicos son aquellos más comunes para la expresión de proteínas recombinantes<sup>48</sup>, como la bacteria *Escherichia coli*<sup>49</sup>, la levadura *Saccharomyces cerevisiae*<sup>50</sup> y las células de mamífero Chinese Hamster Ovary (CHO)<sup>51</sup>. La elección de un organismo hospedador determinado para la expresión de una proteína terapéutica está basada en varios criterios, tales como la aplicación final del producto, la complejidad del mismo, la necesidad de cumplir diferentes requisitos de calidad en el producto, la productividad y el rendimiento económico del sistema y la tecnología de cultivo disponible. En la tabla 2 se resumen las ventajas e inconvenientes de los sistemas de expresión más usados.

Dentro de los sistemas descritos, la mayoría de las proteínas bioterapéuticas aprobadas por la EMA y la FDA se producen en células de mamífero (56%), *E.coli* (24%) y *S.cerevisiae* (13%), con aportaciones menores del resto de sistemas<sup>52</sup>. En la figura 1.6 puede observarse la distribución detallada.

**Tabla 2: Ventajas, desventajas y aplicaciones de los principales sistemas de expresión usados para la producción de proteínas bioterapéuticas (Continúa en pag. 11)**

Sistema de expresión	Aplicaciones	Ventajas	Desventajas
<b>Células de mamífero</b> 	Análisis funcionales y estructurales de proteínas Producción de mAbs Producción de proteínas complejas Producción de Virus	Modificaciones post-transduccionales complejas Proteínas secretadas al medio extracelular Variedad de sistemas de expresión y modificación	Obtención de cepas altamente productivas es compleja Técnicas de cultivo complejas Medio de cultivo caro Baja productividad
<b>Células de insecto</b> 	Análisis funcionales y estructurales de proteínas Producción de proteínas complejas Producción de Virus	Modificaciones post-transduccionales complejas, pero más limitadas Proteínas secretadas al medio extracelular	Diferencias en glicosilación Obtención de cepas altamente productivas es compleja Técnicas de cultivo complejas Medio de cultivo caro Baja productividad

<p><b>Levaduras</b></p> 	<p>Análisis funcionales y estructurales de proteínas Producción de fragmentos de mAbs Expresión de proteínas de complejidad mediana</p>	<p>Modificaciones post-transduccionales simples Puede secretar algunas proteínas Variedad de sistemas de expresión y modificación Fácilmente escalable Medio de cultivo barato Muy alta productividad</p>	<p>Hiperglicosilacion Difícil expresar proteínas muy complejas (mAbs) Algunas proteínas de mamífero son difíciles de secretar Necesidad de sistemas avanzados de cultivo para obtener rendimientos elevados</p>
<p><b>Bacterias</b></p> 	<p>Análisis funcionales y estructurales de proteínas Producción de fragmentos de mAbs Expresión de proteínas</p>	<p>Variedad de sistemas de expresión y modificación Fácilmente escalable Medio de cultivo barato Operación simple Extremadamente alta productividad</p>	<p>Sin modificaciones postraduccionales Difícil expresar proteínas complejas Problemas de solubilidad: Proteínas intracelulares Posibilidad de contaminación con endotoxinas Purificación más compleja</p>
<p><b>Algas</b></p> 	<p>Análisis funcionales y estructurales de proteínas Expresión de proteínas de complejidad mediana</p>	<p>Fácilmente escalable Medio de cultivo barato Operación simple Extremadamente alta productividad</p>	<p>Patrón de glicosilación alterado Pocos sistemas de expresión y modificación Tecnología en desarrollo</p>
<p><b>Organismos superiores (Plantas y animales)</b></p> 	<p>Producción de mAbs Producción de proteínas recombinantes complejas</p>	<p>Modificaciones post-transduccionales complejas Extremadamente alta productividad Fácil purificación</p>	<p>Preocupación por transmisión de enfermedades Coste inversión inicial muy elevado Tecnología en desarrollo</p>



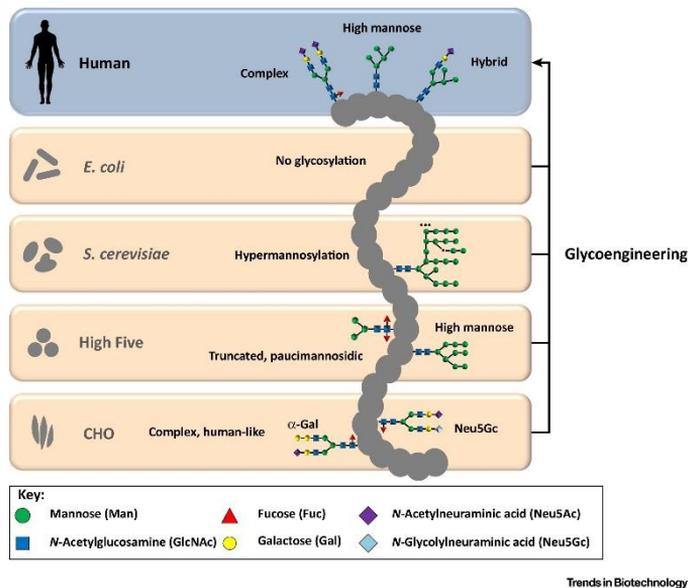
**Figura 1.6: Porcentaje de proteínas bioterapéuticas aprobadas. Distribución por sistema de expresión.**

Las razones de la distribución mayoritaria de la producción de proteínas bioterapéuticas principalmente en células de mamífero y en la bacteria *E.coli* son variadas. *E.coli*, fue el primer organismo usado para la producción de proteínas recombinantes y el know-how y las herramientas disponibles para la modificación genética de este organismo hacen que aun hoy sea el huésped de elección para toda una serie de proteínas que son lo suficientemente simples para ser producidas en sistemas procarióticos, contando estos con la ventaja de su gran productividad<sup>53</sup>. En cuanto a las células de mamífero, las razones de su uso mayoritario serán analizadas con mayor profundidad en el siguiente apartado (1.2.2. Expresión en líneas celulares de mamífero), aunque aquí se adelanta que pueden producir proteínas con una alta complejidad estructural, así como modificaciones postraduccionales no menos complejas<sup>54</sup>.

Aunque resulta difícil realizar predicciones acerca del uso futuro de unos u otros sistemas de expresión, teniendo en cuenta los avances tecnológicos cada vez más rápidos y la introducción de sistemas más novedosos, las razones anteriormente expuestas, además de las razones regulatorias (Que hacen difícil las transiciones rápidas de unos sistemas productivos a otros) permiten predecir que las células de mamífero y *E.coli* seguirán siendo los principales sistemas de expresión de proteínas bioterapéuticas a corto y medio plazo<sup>55</sup>.

### 1.2.2 Expresión en líneas celulares de mamífero

Teniendo en cuenta que las proteínas bioterapéuticas se usaran primeramente como tratamiento en seres humanos, no es sorprendente que las células de mamífero sean el hospedador de elección: Muchas proteínas (Como los mAbs) son extremadamente complejas para su producción en procariotas o incluso en Eucariotas unicelulares, como las levaduras. Estas proteínas requieren de la maquinaria metabólica post-transcripcional que las células de mamífero tienen disponible<sup>56</sup>. Las modificaciones post-transducciones, como la glicosilación (Figura 1.7), son extremadamente influyentes en las características de producto<sup>57</sup>, consiguiendo una mayor calidad y eficacia cuando se comparan con las proteínas aglicosiladas producidas en los hospedadores bacterianos, que tienden a estar mal plegadas o biológicamente inactivas<sup>58</sup>, siendo rápidamente eliminadas de la circulación sanguínea<sup>59</sup>.

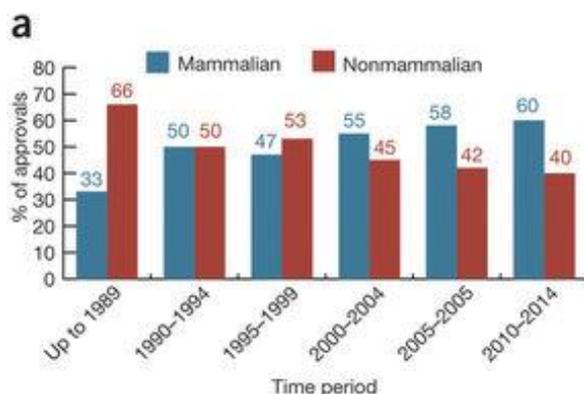


**Figura 1.7 Patrones de glicosilación producidos por diferentes sistemas de expresión en comparación con el patrón humano**

El uso de otros hospedadores eucariotas, como las levaduras o las células vegetales, suele producir glicosilaciones diferentes a las humanas, o también hiperglicosilaciones<sup>60</sup>, que pueden llevar a una respuesta inmunogénica por

parte del paciente tratado<sup>61</sup>. Las células de insecto, por otra parte, poseen una limitada capacidad de glicosilación<sup>62</sup>, razón por la cual se usan mayoritariamente para la producción de vacunas virales<sup>63</sup>.

La capacidad de las células de mamífero de llevar a cabo estas modificaciones y la gran cantidad de herramientas desarrolladas para el cultivo con este sistema de expresión explican actualmente su mayor utilización. Asimismo, las capacidades secretoras de las células de mamífero garantizan la obtención de la proteína de interés en el sobrenadante del medio de cultivo<sup>64</sup>, facilitando los procesos de purificación subsiguientes (Ver apartado 1.2.3.). La preocupación inicial acerca de los bajos rendimientos productivos de las células de mamífero ha ido decreciendo en el tiempo (Figura 1.8), conforme las modernas técnicas desarrolladas han conseguido rutinariamente a títulos de proteína recombinante de 1-2 g/L, con producciones descritas de hasta 20g/L<sup>65</sup>.



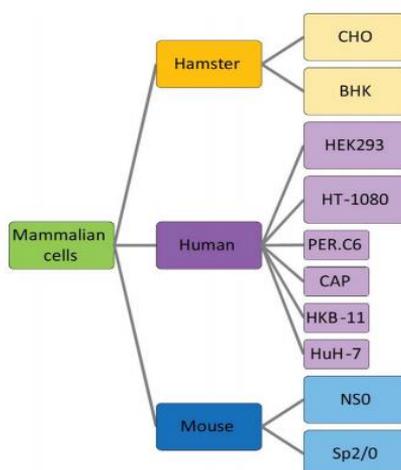
**Figura 1.8 Distribución relativa de la producción de proteínas bioterapéuticas según su producción en células de mamífero o en otros sistemas y evolución en los periodos de tiempo señalados**

Existen multitud de células derivadas de mamíferos que se pueden cultivar actualmente. El cultivo de células de mamífero se aplica, aparte de a la ya descrita producción de proteínas de interés terapéutico, a la investigación del metabolismo celular, la producción de células madre para diversos fines (Trasplantes, terapias celulares, construcción de órganos), la producción de tejidos, etc. Sin embargo, solo unos cuantos tipos celulares son usados actualmente como células

hospedadoras para la producción de proteínas de interés terapéutico, siendo la mayoría de ellas líneas celulares derivadas de hamsters, ratones o seres humanos (Figura 1.9)

De manera muy mayoritaria (70% de los biológicos aprobados) las células CHO son el huésped preferido para la producción de proteínas terapéuticas<sup>66</sup>. Otras células, como las NS0 son preferidas para la generación de hibridomas productores de mAbs, aunque la tendencia se orienta a la producción de mAbs también en CHO<sup>67</sup>.

Las razones principales están en la alta robustez de la línea celular, su capacidad para alcanzar altas densidades celulares, así como la disponibilidad de herramientas para aumentar significativamente la producción específica de las mismas. No obstante, estas células no pueden realizar todas las glicosilaciones humanas y producen algunos tipos de glicosilaciones potencialmente inmunogénicos<sup>68</sup>



**Figura 1.9 Principales líneas celulares usadas para la producción de proteínas bioterapéuticas, junto con los organismos de los que derivan.**

Por esta razón, la producción con células humanas cobra cada vez mayor interés, con nuevos biológicos aprobados cada año (Tabla 3)<sup>69</sup>.

**Tabla 3: Biológicos aprobados producidos en líneas celulares humanas<sup>68</sup>.**

Línea celular	Producto	Indicación	Aprobado FDA	Aprobado EMA
<b>HEK293</b>	Drotrecogin alfa	Septicemia severa	Aprobado 2001 Retirado 2011	Aprobado 2002 Retirado 2011
	rFVIII Fc	Hemofilia A	Aprobado 2014	Enviado 2014
	rFIX Fc	Hemofilia B	Aprobado 2014	NA
	Dulaglutide	Tipe 2 diabetes	Aprobado 2014	Enviado 2014
	Human-cl rhFVIII	Hemofilia A	Enviado 2014	Aprobado 2014
<b>HT-1080</b>	Agalsidase alfa	Enfermedad de Fabry	NA	Aprobado 2001
	Epoetin delta	Anemia por fallo crónico renal	NA	Aprobado 2002; Retirado 2009
	Idursulfase	Síndrome de Hunter	Aprobado 2006	Aprobado 2007
	Velaglucerasa alfa	Enfermedad de Gaucher	Aprobado 2010	Aprobado 2010
<b>PER.C6</b>	MOR103	Artritis reumatoide, Esclerosis múltiple	Fase 2	Fase 2
	CL184	Rabia	NA	NA

A parte de las ventajas relacionadas con la reproducción de un patrón de glicosilación totalmente humano, conduciendo a la obtención de una proteína más tolerable por el paciente, algunas células humanas tienen otras ventajas que las hacen comparables a las CHO, como la facilidad de su modificación genética<sup>70</sup> y su cultivo sencillo en suspensión en medios que no contienen suero bovino<sup>71</sup>. No obstante, existen también algunas desventajas, como la posibilidad de contaminación viral con virus humanos<sup>72</sup> y la menor experiencia con estos tipos celulares, que supone la mayor escasez de herramientas genéticas y de cultivo en comparación con las células CHO. El hecho de desarrollar dicha estrategia para una línea celular humana motiva la realización del presente trabajo.

### 1.2.3 Características de los procesos de producción

La mayoría de los procesos de producción de biológicos a escala industrial en células de mamífero se llevan a cabo en biorreactores de tanque agitado usando células en suspensión<sup>73</sup>, aunque existen procesos industriales implementados cultivando células adherentes en biorreactores usando soportes poliméricos o *carriers*<sup>74</sup>.

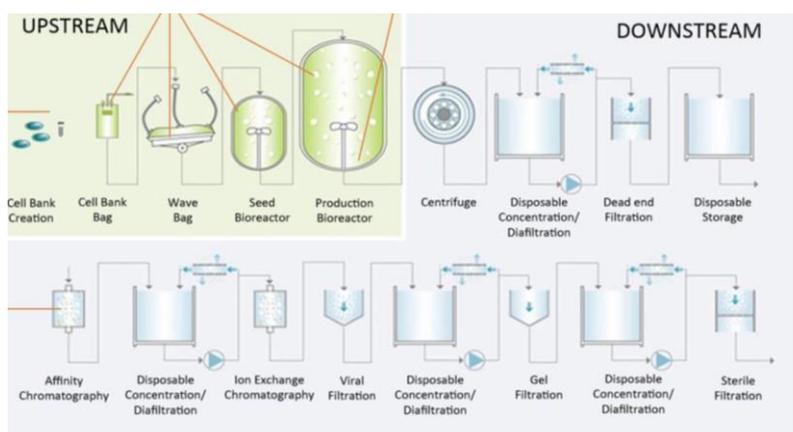
Los procesos de producción se dividen normalmente de las siguientes fases:

1. *Upstream*: Se incluye la descongelación del inóculo inicial de células a partir de un Working Cell Bank (WCB). Este ha sido, a su vez preparado a partir de un Master Cell Bank (MCB), siendo ambos conservados a temperaturas criogénicas. Se incluyen, asimismo, los pasos destinados al escalado del inóculo en los diferentes sistemas de cultivo hasta llegar a la cantidad de células necesaria para inocular el biorreactor de producción. Típicamente, se realizan diferentes pruebas de calidad de los medios de cultivo y de las líneas celulares (Esterilidad, contaminación por micoplasmas, endotoxinas, etc...), que son requeridos por las agencias regulatorias.
2. Producción: Es la fase de cultivo en biorreactor, en la cual las células son cultivadas en condiciones controladas de  $T^a$ , pH y  $pO_2$  gracias a los sistemas automatizados de control de los que dispone a través la Unidad Digital de Control (DCU). Normalmente, se realiza un seguimiento *on-line* de las variables que el biorreactor puede mediar a través de sus sondas (Típicamente,  $T^a$ , pH y  $pO_2$ , aunque existen sondas capaces de determinar otros parámetros como potencial Redox, número de células, etc), así como un seguimiento *off-line* de otras variables (Contaje de células viables, análisis de metabolitos, análisis de la producción...) usando muestras extraídas asepticamente de manera periódica.
3. *Downstream*: Son las etapas destinadas a la separación, purificación y acondicionado del producto de interés. En un proceso de producción en células de mamífero, este constará, típicamente de:
  - a. Una etapa de separación solido-liquido mediante filtración o centrifugación con el fin de separar las células del caldo de cultivo que contiene la proteína de interés.
  - b. Una etapa de concentración y diálisis mediante ultrafiltración tangencial, usando membranas adecuadas al tamaño molecular del producto, con el fin de reducir el volumen a procesar y dejar el caldo en las condiciones adecuadas de pH, conductividad y concentración salina necesarias para las etapas subsiguientes.
  - c. Una o varias etapas de cromatografía, normalmente de afinidad para los mAbs o de Interacción Ionica (IEX) o intercambio

hidrofóbico (HIC), con el fin de obtener el producto con la pureza requerida (>99%).

- d. Una o varias etapas de acondicionamiento final, con filtraciones o cromatografías adicionales para la eliminación de los contaminantes más resilientes (Virus, endotoxinas, DNA y proteínas del Huésped, etc) y diálisis o liofilizaciones para dejar el producto final en las condiciones de conservación estable previamente determinadas, con el fin de proceder al envasado final del producto.

En la figura 1.10 se pueden observar gráficamente las diferentes fases descritas. Se ha de tener en cuenta que la descripción proporcionada es generalista, y que, en cada proceso de producción, el número, composición e, incluso, el orden de las etapas puede variar sustancialmente dependiendo de numerosos factores, como los requerimientos de pureza, los títulos de producto obtenidos o la línea celular o medio de cultivo utilizados.



**Figura 1.10: Etapas de un proceso de producción de proteínas bioterapéuticas usando células de mamífero.**

Normalmente, cada paso de purificación conlleva la pérdida de una fracción del producto y, dado que los productos terapéuticos requieren bastantes pasos, los rendimientos globales suelen ser de 40-60%. El rendimiento total del proceso, así como el de cada etapa individual, se calcula según la siguiente expresión:

*Rendimiento (%): (Cantidad de producto final/ Cantidad de producto inicial) x 100*

Los rendimientos parciales requeridos para cada etapa han de situarse en cotas superiores al 90-95%, ya que, incluso con esos rendimientos tan altos, las pérdidas debido a las etapas sucesivas de purificación conllevan unos rendimientos finales muy inferiores<sup>75</sup>. Por esta razón, el objetivo ha de ser conseguir la mejor purificación en el menor número de pasos. Además, siempre será deseable partir de la mayor concentración de producto posible, dado que el rendimiento de algunas etapas (Cromatografía y filtración tangencial especialmente) se puede ver severamente afectado en función de la concentración de producto inicial<sup>76</sup>.

### **1.3 Caso de estudio. Aumento de la producción específica de biológicos en células humanas**

#### **1.3.1. Importancia de la producción volumétrica en los procesos**

La cantidad final de producto obtenido en un bioproceso es crítica para la determinación de la viabilidad técnica y económica del mismo. Siempre será deseable maximizar la concentración del producto de interés por varios motivos:

- Como en todo proceso productivo, la obtención de un producto en mayores cantidades permite abaratar el mismo y competir con los posibles rivales en una mejor posición.
- Dada la popularidad y la efectividad de las moléculas bioterapéuticas, se prevé que la demanda seguirá al alza (Apartado 1.1.3. Mercado y regulación.)
- Como se ha comentado en el apartado anterior (1.2.3. Características de los procesos de producción), los procesos de purificación tienen pérdidas fijas de producto que pueden verse aumentadas cuanto menor sea la concentración de producto al inicio del proceso (Rendimiento variable del proceso)

La acumulación de producto con respecto al tiempo en un bioproceso típico que use células animales (Productividad volumétrica) depende de varios parámetros, según se desprende de la función:

$$\frac{\delta(P \cdot V)}{\delta t} = qP \cdot X \cdot V$$

Siendo:

P: Concentración de producto

V: Volumen del biorreactor

X: Concentración de biomasa

$qP$ : Velocidad específica de acumulación de producto

$qP$ , a su vez, es el producto de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) y de la producción específica  $\alpha$ :

$$qP = \alpha \cdot \mu$$

Siendo esta el rendimiento entre la concentración de producto y la concentración de biomasa. Esta es una propiedad intrínseca del biocatalizador utilizado, es decir, la cantidad de producto que cada célula es capaz de producir:

$$\alpha = Y_{(P/X)}$$

De lo anteriormente expuesto, se puede extraer la conclusión de que, para conseguir la mayor cantidad de producto al final del proceso productivo caben 4 vías a seguir: 1) Aumentar el tiempo de cultivo, 2) aumentar el volumen del Biorreactor, 3) aumentar la concentración final de biomasa o 4) conseguir un biocatalizador (célula) con mayor productividad específica.

Las dos primeras alternativas, aunque comúnmente utilizadas (especialmente el aumento de volumen) presentan varias limitaciones, dado que prolongar el tiempo de cultivo no es posible en muchas ocasiones por motivos fisiológicos y aumentar el volumen del reactor representa un hándicap para la economía del proceso al aumentar los costes de operación, además de ser un reto técnico en muchas ocasiones.

Por esta razón, la optimización de los bioprocesos suele centrarse en tratar de obtener la mayor concentración posible de células, a través de la ingeniería del bioproceso (estrategias de cultivo más avanzadas, medios de cultivo optimizados) y en la obtención de los biocatalizadores con las mejores características productivas posibles (mayor  $\alpha$ ), a través, principalmente, de la modificación genética del biocatalizador. La mejora de la producción específica de las líneas celulares productoras será el fin último del presente trabajo de tesis.

### 1.3.2. Selección de la célula hospedadora: La célula HEK293.

Como se ha comentado anteriormente (Apartado 1.2.2. Producción en células de mamífero), el uso de células humanas para la producción de proteínas terapéuticas está registrando un importante crecimiento en los últimos años, debido a los factores ya comentados previamente, especialmente por los posibles problemas en el patrón de glicosilación derivado de la producción en líneas celulares no-humanas. En la tabla 4 se resumen los efectos que tienen las diferentes glicoestructuras y su presencia en las diferentes líneas celulares. Se pueden comprobar las notables diferencias existentes entre los patrones humanos y los de las líneas CHO y NS0, comúnmente usadas en la industria.

**Tabla 4. Diferencias en las glicoestructuras producidas en las diferentes líneas celulares<sup>77</sup>**

Glicoestructura	Impacto	CHO	NS0	Humanas
<b>Sialilación</b>	Sensibilidad a la proteólisis	Variable	Variable	35-40%
<b>N-acetilmurámico</b>	Glicoestructura humana	Alta	Baja	100%
<b>N-glicolilmurámico</b>	Inmunogenica	Baja	>50%	No
<b>Enlace 1-6</b>	Desconocido	No	No	Variable
<b>A1-3Gal</b>	Eliminación más rápida de la sangre	Variable	Alta	No
<b>N-acetil-D-glucosamina</b>	Inhibición de la fucosilación	No	No	10%
<b>Sin fucosilación</b>	Aumento de la Toxicidad dependiente de anticuerpo	5%	10-50%	5%
<b>Estructuras G0</b>	Aumento de la dimerización, incremento de la toxicidad dependiente del complemento	Variable	Variable	Baja

De las líneas celulares humanas disponibles que pueden ser una alternativa, la célula HEK293 es la que presenta mayor número de proteínas terapéuticas aprobadas por las agencias regulatorias (Tabla 3).

La línea HEK293 (*Human Embryonic Kidney* 293) es una línea celular humana obtenida mediante la transformación con un adenovirus de células obtenidas del riñón de un feto humano por el investigador Frank Graham en 1977 en su experimento N°293, produciéndose una línea estable inmortalizada<sup>78</sup>. Aunque ha sido usada en el pasado como célula modelo de tejido renal o epitelial, las últimas investigaciones demuestran que es más probable que provenga de una célula adrenal, con ciertas características neuronales<sup>79</sup>.

Esta célula presenta numerosas ventajas a la hora de ser usada como alternativa humana a la célula CHO, actualmente dominante en la industria: En primer lugar, es una célula tanto fácilmente adaptable para el cultivo en medio sin suero como a crecimiento en suspensión, ambas características de gran importancia para la industria farmacéutica<sup>71</sup>. Además, existe mucha experiencia en el cultivo de esta línea celular, habiéndose conseguido cultivos con altas densidades celulares. Aunque, sin duda, la principal ventaja de la línea es su elevada capacidad de transformación con elementos genéticos heterólogos, lo que permite una sencilla modificación genética<sup>80</sup>. Esta característica ha generalizado su uso como hospedador para expresión transiente de proteínas recombinantes, de gran importancia en investigación básica<sup>81</sup>, pero de menor aplicabilidad en la industria, que exige trabajar con cepas estables altamente productivas para conseguir bioprocesos económicos y mantener la reproducibilidad entre los distintos lotes<sup>82</sup>.

En este punto, la línea HEK293 presenta también varios desafíos a la hora de igualar a la línea CHO. Estos, generalmente, se traducen en una menor producción específica en cepas estables debido a la carencia de herramientas para el desarrollo de líneas celulares recombinantes altamente productoras que ya existen y han tenido un amplio desarrollo para células CHO, pero no para HEK293<sup>81</sup>. Entre estos elementos cabe destacar, los marcadores de selección metabólicos<sup>83</sup>, sistemas de integración dirigida<sup>84</sup>, promotores fuertes y *enhancers*, etc. Por todo ello, con el fin de desarrollar herramientas para la aumentar la

productividad específica de proteínas recombinantes, esta será la línea celular escogida para realizar el presente trabajo de tesis doctoral.

### **1.3.3. Proteínas modelo: eGFP, Interferón gamma y Trastuzumab**

Para la realización del presente trabajo se construirán distintas líneas celulares que expresen proteínas modelo para validar las diferentes herramientas desarrolladas. De manera general, en primer lugar, se usará la proteína eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*) como proteína marcadora para evaluar las estrategias más eficaces con el fin de obtener la mayor producción específica. Posteriormente, los resultados serán confirmados expresando dos proteínas de interés bioterapéutico que representen ampliamente a los principales grupos de bioterapéuticos descritos en el apartado 1.1.2. (Tipos de moléculas y aplicaciones). Estos serán la citoquina terapéutica interferón gamma ( $\text{IFN}\gamma$ ) y el anticuerpo monoclonal terapéutico Trastuzumab.

El  $\text{IFN}\gamma$  es proteína monomérica de 17Kda compuesta por un núcleo de 6 hélices alfa (Figura 1.11A). La forma biológicamente activa es un dímero<sup>85</sup>. Es una citoquina crítica por su papel en la inmunidad innata y adaptativa contra infecciones virales, bacterianas y de protozoos, siendo activador de los macrófagos e inductor del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II. Tiene efectos inmunomodulatorios, inmunoestimuladores e inhibidores de la replicación viral. El  $\text{IFN}\gamma$  se produce de manera natural en las células NK como parte de la respuesta inmune, así como por parte de los linfocitos T efectores CD4 y CD8 cuando se desarrolla la inmunidad dependiente de antígeno<sup>86</sup>.

Ha sido usado como proteína modelo en varios estudios, produciéndose en una gran variedad de hospedadores. Industrialmente se produce en *E.coli*<sup>87</sup> y es comercializado por Horizon Pharma bajo la marca ACTIMMUNE®, estando aprobado para el tratamiento de la enfermedad granulomatosa crónica y la osteoporosis. No obstante, se ha demostrado que su vida media en sangre es corta, debido probablemente a su falta de glicosilación. El  $\text{IFN}\gamma$  producido en HEK293 ha demostrado una mayor eficacia terapéutica<sup>88</sup>.

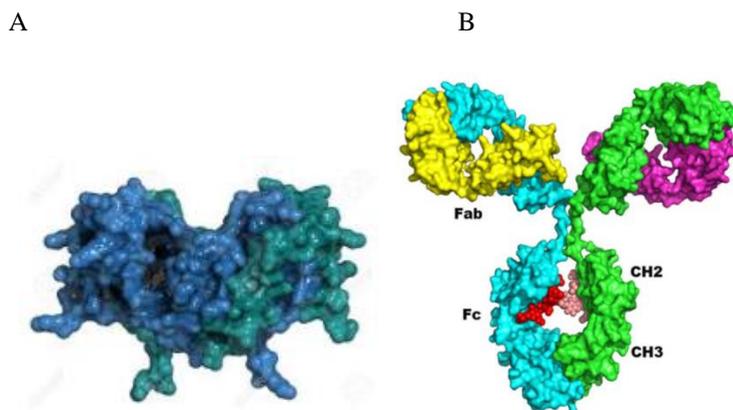
El Trastuzumab es un anticuerpo monoclonal terapéutico que reconoce el antígeno de superficie celular HER-2 (*Human Epithelial Receptor*). Como todos los anticuerpos, está formado por dos cadenas polipeptídicas independientes unidas por puentes disulfuro (Figura 1.11B), representando una molécula más difícil de expresar de forma recombinante, y se ha usado como modelo en varios trabajos de producción de mAbs, principal razón de su elección en el presente trabajo.

El Trastuzumab es un anticuerpo humanizado, creado mediante ingeniería de proteínas a partir de una versión quimérica formada por una IgG1 humana y un anticuerpo Anti-HER2 desarrollado mediante la tecnología de hibridomas por la empresa Genentech. Esta humanización permite reducir la respuesta inmunitaria del huésped, manteniendo la capacidad original de reconocimiento del antígeno<sup>89</sup>.

El Trastuzumab es comercializado por la empresa Roche bajo la marca comercial Herceptin® como tratamiento para el cáncer de mama HER2 positivo (Aprox, 25-30% de los casos totales). La unión del anticuerpo al receptor en las células cancerosas produce una menor proliferación de las mismas, al impedir la unión del factor EGF requerido para la activación de una ruta de proliferación rápida del cáncer. Además, se ha observado que la unión a la superficie de las células induce a las células inmunitarias a eliminar a la célula marcada mediante diversas respuestas citotóxicas<sup>90</sup>.

Asimismo, el trastuzumab es la base para la producción del Anticuerpo conjugado (ADC) Trastuzumab-emtansina (Comercializado por Roche bajo la marca Kadcyła), fabricado mediante la conjugación heterogénea de residuos lisina del trastuzumab con la droga citotóxica DM-1 (Emtansina). Se ha demostrado una mayor eficacia terapéutica de esta forma<sup>91</sup>.

El Trastuzumab es producido industrialmente en células CHO, aunque se ha expresado con éxito en diversos tipos celulares<sup>92</sup>. Dado que se encuentra fuera del periodo de protección de su patente, se han producido fármacos biosimilares basados en el trastuzumab producidos en otros sistemas<sup>93</sup>.



**Figura 1.11. Estructura tridimensional del interferón gamma (A) y del trastuzumab (B) (Imágenes a diferente escala)**

Por todo lo anteriormente dicho, el objetivo de la presente tesis doctoral será la producción de  $\text{IFN}\gamma$  y trastuzumab usando células HEK293, desarrollando herramientas y metodologías que permitan obtener la mayor productividad del sistema.

#### 1.4 Referencias

1. Research, C. for B. E. and. FDA Basics - What is a biological product? Disponible en: <https://www.fda.gov/aboutfda/transparency/basics/ucm194516.htm>. (Accedido: 30.<sup>a</sup> agosto 2017)
2. Schwerin, A. von, Schwerin, A. von, Stoff, H. & Wahrig, B. *Biologics : a history of agents made from living organisms in the twentieth century*.
3. 2017 TRENDS IN BIOSIMILAR REPORT.
4. Shampo, M. A. & Kyle, R. A. Frederick Banting—Nobel Laureate for Discovery of Insulin. *Mayo Clin. Proc.* **80**, 576 (2005).
5. Hintz, R. L. *et al.* BIOSYNTHETIC METHIONYL HUMAN GROWTH HORMONE IS BIOLOGICALLY ACTIVE IN ADULT MAN. *Lancet* **319**, 1276-1279 (1982).
6. Birch, J. R. & Onakunle, Y. en *Therapeutic Proteins* 001-016 (Humana Press). doi:10.1385/1-59259-922-2:001
7. Ayyar, V. S. History of growth hormone therapy. *Indian J. Endocrinol. Metab.* **15 Suppl 3**, S162-5 (2011).
8. Usmani, S. S. *et al.* THPdb: Database of FDA-approved peptide and

- protein therapeutics. *PLoS One* **12**, e0181748 (2017).
9. Leader, B., Baca, Q. J. & Golan, D. E. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 21-39 (2008).
  10. Kinch, M. S. An overview of FDA-approved biologics medicines. *Drug Discov. Today* **20**, 393-398 (2015).
  11. Franchini, M. Plasma-derived versus recombinant Factor VIII concentrates for the treatment of haemophilia A: recombinant is better. *Blood Transfus.* **8**, 292-6 (2010).
  12. Chang, R. *et al.* Treatment of high-risk venous thrombosis patients using low-dose intraclot injections of recombinant tissue plasminogen activator and regional anticoagulation. *J. Vasc. Interv. Radiol.* **24**, 27-34.e1 (2013).
  13. Mizuma, A. & Takizawa, S. [G-CSF treatment]. *Nihon Rinsho.* **74**, 643-8 (2016).
  14. Takeda, A. *et al.* Recombinant human growth hormone for the treatment of growth disorders in children: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol. Assess. (Rockv).* **14**, 1-209, iii-iv (2010).
  15. Vajo, Z., Fawcett, J. & Duckworth, W. C. Recombinant DNA Technology in the Treatment of Diabetes: Insulin Analogs. *Endocr. Rev.* **22**, 706-717 (2001).
  16. Wan, B. *et al.* Recombinant human interleukin-11 (IL-11) is a protective factor in severe sepsis with thrombocytopenia: A case-control study. *Cytokine* **76**, 138-143 (2015).
  17. Errante, P. R., Frazão, J. B. & Condino-Neto, A. The use of interferon-gamma therapy in chronic granulomatous disease. *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.* **3**, 225-30 (2008).
  18. Group, T. I. M. S. S. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* **43**, 655-61 (1993).
  19. Yang, X., Yuan, Y., Zhan, C.-G. & Liao, F. Uricases as therapeutic agents to treat refractory gout: Current states and future directions. *Drug Dev. Res.* **73**, 66-72 (2012).
  20. Flume, P. A. *et al.* Cystic Fibrosis Pulmonary Guidelines. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **176**, 957-969 (2007).
  21. van Oers, M. H. J. *et al.* Rituximab maintenance improves clinical outcome of relapsed/resistant follicular non-Hodgkin lymphoma in patients both with and without rituximab during induction: results of a prospective randomized phase 3 intergroup trial. *Blood* **108**, 3295-301 (2006).

22. Emens, L. A. & Davidson, N. E. Trastuzumab in breast cancer. *Oncology (Williston Park)*. **18**, 1117-28-2, 1137-8 (2004).
23. Van Cutsem, E. *et al.* Cetuximab and Chemotherapy as Initial Treatment for Metastatic Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1408-1417 (2009).
24. Lipsky, P. E. *et al.* Infliximab and Methotrexate in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *N. Engl. J. Med.* **343**, 1594-1602 (2000).
25. Pittas, A. G., Westcott, G. P. & Balk, E. M. Efficacy, safety, and patient acceptability of Technosphere inhaled insulin for people with diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **3**, 886-894 (2015).
26. Andrews, S., Lee, J. W., Choi, S.-O. & Prausnitz, M. R. Transdermal Insulin Delivery Using Microdermabrasion. *Pharm. Res.* **28**, 2110-2118 (2011).
27. Moorkens, E. *et al.* The Market of Biopharmaceutical Medicines: A Snapshot of a Diverse Industrial Landscape. *Front. Pharmacol.* **8**, 314 (2017).
28. Market Information - Our Business - GENE TECHNO SCIENCE. Disponible en: <http://www.g-gts.com/en/business/market/>. (Accedido: 3.<sup>a</sup> enero 2018)
29. Global Biologics Market, Industry and R&D: Forecasts 2015-2025 - PHA0060 - Report - Pharma - Market Research Reports. Market Analysis Company. Visiongain. Disponible en: <https://www.visiongain.com/Report/1485/Global-Biologics-Market-Industry-and-R-D-Forecasts-2015-2025>. (Accedido: 3.<sup>a</sup> enero 2018)
30. (Rob) Aggarwal, S. What's fueling the biotech engine—2012 to 2013. *Nat. Biotechnol.* **32**, 32-39 (2014).
31. CFR - Code of Federal Regulations Title 21.
32. THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. *COMMISSION DIRECTIVE 2003/94/EC*. (2003).
33. Geigert, J. en *The Challenge of CMC Regulatory Compliance for Biopharmaceuticals and Other Biologics* 21-33 (Springer New York, 2013). doi:10.1007/978-1-4614-6916-2\_2
34. Bracewell, D. G., Francis, R. & Smales, C. M. The future of host cell protein (HCP) identification during process development and manufacturing linked to a risk-based management for their control. *Biotechnol. Bioeng.* **112**, 1727-37 (2015).
35. Yang, H. Establishing Acceptable Limits of Residual DNA. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* **67**, 155-163 (2013).

36. Strauss, D. *et al.* Characterizing the impact of pressure on virus filtration processes and establishing design spaces to ensure effective parvovirus removal. *Biotechnol. Prog.* **33**, 1294-1302 (2017).
37. Du, Z. *et al.* Use of a small molecule cell cycle inhibitor to control cell growth and improve specific productivity and product quality of recombinant proteins in CHO cell cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **112**, 141-55 (2015).
38. Schmelzer, A. E. & Miller, W. M. Hyperosmotic Stress and Elevated pCO<sub>2</sub> Alter Monoclonal Antibody Charge Distribution and Monosaccharide Content. *Biotechnol. Prog.* **18**, 346-353 (2002).
39. Ivarsson, M., Villiger, T. K., Morbidelli, M. & Soos, M. Evaluating the impact of cell culture process parameters on monoclonal antibody N-glycosylation. *J. Biotechnol.* **188**, 88-96 (2014).
40. EMA. Guideline on process validation for the manufacture of biotechnology-derived active substances and data to be provided in the regulatory submission. (2014).
41. United States Pharmacopeial Convention. *USP35 NF30, 2012: U. S. Pharmacopoeia National Formulary*. (United States Pharmacopeial, 2011).
42. Sanchez-Garcia, L. *et al.* Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update. *Microb. Cell Fact.* **15**, 33 (2016).
43. Gietz, R. D. & Schiestl, R. H. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat. Protoc.* **2**, 31-34 (2007).
44. Hanahan, D., Jessee, J. & Bloom, F. R. [4] Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol.* **204**, 63-113 (1991).
45. Aps, L. R. M. M. *et al.* Bacterial spores as particulate carriers for gene gun delivery of plasmid DNA. *J. Biotechnol.* **228**, 58-66 (2016).
46. Kotnik, T. *et al.* Electroporation-based applications in biotechnology. *Trends Biotechnol.* **33**, 480-488 (2015).
47. Hong, J. *et al.* Comprehensive analysis of sequence-specific stability of siRNA. *FASEB J.* **24**, 4844-4855 (2010).
48. Jozala, A. F. *et al.* Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification. *Brazilian J. Microbiol.* **47**, 51-63 (2016).
49. Baeshen, M. N. *et al.* Production of Biopharmaceuticals in *E. coli*: Current Scenario and Future Perspectives. *J. Microbiol. Biotechnol* **25**, 953-962 (2015).
50. Nielsen, J. Production of biopharmaceutical proteins by yeast: advances through metabolic engineering. *Bioengineered* **4**, 207-11 (2013).

51. Fischer, S., Handrick, R. & Otte, K. The art of CHO cell engineering: A comprehensive retrospect and future perspectives. *Biotechnol. Adv.* **33**, 1878-1896 (2015).
52. Baeshen, N. A. *et al.* Cell factories for insulin production. *Microb. Cell Fact.* **13**, 141 (2014).
53. Ferrer-Miralles, N., Domingo-Espín, J., Corchero, J., Vázquez, E. & Villaverde, A. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microb. Cell Fact.* **8**, 17 (2009).
54. Butler, M. & Spearman, M. The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* **30**, 107-112 (2014).
55. Jagschies, G., Lindskog, E., Łacki, K. & Galliher, P. M. *Biopharmaceutical processing : development, design, and implementation of manufacturing processes.*
56. Verma, R., Boleti, E. & George, A. J. . Antibody engineering: Comparison of bacterial, yeast, insect and mammalian expression systems. *J. Immunol. Methods* **216**, 165-181 (1998).
57. Jefferis, R. Glycosylation of Recombinant Antibody Therapeutics. *Biotechnol. Prog.* **21**, 11-16 (2008).
58. MURAKI, M. *et al.* Expression of synthetic human lysozyme gene in Escherichia coli. *Agric. Biol. Chem.* **50**, 713-723 (1986).
59. Goettig, P. Effects of Glycosylation on the Enzymatic Activity and Mechanisms of Proteases. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
60. Nakamura, S., Takasaki, H., Kobayashi, K. & Kato, A. Hyperglycosylation of hen egg white lysozyme in yeast. *J. Biol. Chem.* **268**, 12706-12712 (1993).
61. van Beers, M. M. C. & Bardor, M. Minimizing immunogenicity of biopharmaceuticals by controlling critical quality attributes of proteins. *Biotechnol. J.* **7**, 1473-1484 (2012).
62. Rendić, D., Wilson, I. B. H. & Paschinger, K. The glycosylation capacity of insect cells. *Croat. Chem. Acta* **81**, 7-21 (2008).
63. Cox, M. M. J. Recombinant protein vaccines produced in insect cells. *Vaccine* **30**, 1759-1766 (2012).
64. Lakkaraju, A. K. K. *et al.* Efficient secretion of small proteins in mammalian cells relies on Sec62-dependent posttranslational translocation. *Mol. Biol. Cell* **23**, 2712-22 (2012).
65. Chon, J. H. & Zarbis-Papastoitis, G. Advances in the production and downstream processing of antibodies. *N. Biotechnol.* **28**, 458-463 (2011).

66. Butler, M. & Spearman, M. The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* **30**, 107-112 (2014).
67. Kunert, R. & Reinhart, D. Advances in recombinant antibody manufacturing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 3451-61 (2016).
68. Dumont, J., Euwart, D., Mei, B., Estes, S. & Kshirsagar, R. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Crit. Rev. Biotechnol.* **36**, 1110-1122 (2016).
69. Dumont, J., Euwart, D., Mei, B., Estes, S. & Kshirsagar, R. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Crit. Rev. Biotechnol.* **36**, 1110-1122 (2016).
70. Kim, J. Y., Kim, Y.-G. & Lee, G. M. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**, 917-930 (2012).
71. Liste-Calleja, L., Lecina, M. & Cairó, J. J. HEK293 cell culture media study towards bioprocess optimization: Animal derived component free and animal derived component containing platforms. *J. Biosci. Bioeng.* **117**, 471-477 (2014).
72. Rubino, M. J. Experiences with HEK293: A Human Cell Line. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* **64**, 392-5
73. Jossen, V., Eibl, R., Pörtner, R., Kraume, M. & Eibl, D. en *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* 179-215 (Elsevier, 2017). doi:10.1016/B978-0-444-63663-8.00007-0
74. Szczypka, M., Splan, D., Woolls, H. & Brandwein, H. Single-Use Bioreactors and Microcarriers Scalable Technology for Cell-Based Therapies. *54 BioProcess Int.* **12**, (2014).
75. Hanke, A. T. & Ottens, M. Purifying biopharmaceuticals: knowledge-based chromatographic process development. *Trends Biotechnol.* **32**, 210-220 (2014).
76. Liu, H. F., Ma, J., Winter, C. & Bayer, R. Recovery and purification process development for monoclonal antibody production. *MAbs* **2**, 480-99 (2010).
77. Swiech, K., Picanço-Castro, V. & Covas, D. T. Human cells: New platform for recombinant therapeutic protein production. *Protein Expr. Purif.* **84**, 147-153 (2012).
78. Russell, W. C., Graham, F. L., Smiley, J. & Nairn, R. Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *J. Gen. Virol.* **36**, 59-72 (1977).
79. Lin, Y.-C. *et al.* Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat. Commun.* **5**, 4767

(2014).

80. Thomas, P. & Smart, T. G. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **51**, 187-200 (2005).
81. Fliedl, L., Grillari, J. & Grillari-Voglauer, R. Human cell lines for the production of recombinant proteins: on the horizon. *N. Biotechnol.* **32**, 673-679 (2015).
82. Parren, P. W. H. I. & Lugovskoy, A. A. Therapeutic antibody engineering: Current and future advances driving the strongest growth area in the pharmaceutical industry. en *MAbs* **5**, 175-177 (Taylor & Francis, 2013).
83. Lucas, B. K. *et al.* High-Level Production of Recombinant Proteins in CHO Cells Using a Dicistronic DHFR Intron Expression Vector. *Nucleic Acids Res.* **24**, 1774-1779 (1996).
84. Kawabe, Y. *et al.* Repeated integration of antibody genes into a pre-selected chromosomal locus of CHO cells using an accumulative site-specific gene integration system. *Cytotechnology* **64**, 267-279 (2012).
85. MalekSabet, N. *et al.* The Structural Characterization of Recombinant Human Interferon Gamma. *J. Biol. Sci.* **8**, 1087-1091 (2008).
86. D'Andrea, A. *et al.* Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J. Exp. Med.* **178**, 1041-8 (1993).
87. Simons, G., Remaut, E., Allet, B., Devos, R. & Fiers, W. High-level expression of human interferon gamma in Escherichia coli under control of the pL promoter of bacteriophage lambda. *Gene* **28**, 55-64 (1984).
88. Razaghi, A. *et al.* Improved therapeutic efficacy of mammalian expressed-recombinant interferon gamma against ovarian cancer cells. *Exp. Cell Res.* **359**, 20-29 (2017).
89. Arteaga, C. L. Trastuzumab, an appropriate first-line single-agent therapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res.* **5**, 96 (2003).
90. Hsu, J. L. & Hung, M.-C. en 51-66 (Springer, Cham, 2018). doi:10.1007/978-3-319-67932-7\_3
91. Verma, S. *et al.* Trastuzumab Emtansine for HER2-Positive Advanced Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **367**, 1783-1791 (2012).
92. Delafosse, L., Xu, P. & Durocher, Y. Comparative study of polyethylenimines for transient gene expression in mammalian HEK293 and CHO cells. *J. Biotechnol.* **227**, 103-111 (2016).

93. Grohs, B. M. *et al.* Plant-Produced Trastuzumab Inhibits the Growth of HER2 Positive Cancer Cells. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 10056-10063 (2010).

# CAPITULO 2

## 2. OBJETIVOS

El trabajo que se presenta se enmarca en el conjunto de actividades científicas del *Grup d'Enginyeria Cel·lular i Bioprocessos* del Departamento de Ingeniería Química de la UAB. El objetivo del grupo es el desarrollo, optimización y escalado de bioprocesos basados en cultivo celular, específicamente usando células de mamífero.

El trabajo actual está enfocado al desarrollo de herramientas y metodologías para la obtención de líneas celulares humanas productoras de proteínas terapéuticas recombinantes, usando como modelo la línea celular humana HEK293 y como productos de interés, el IFN $\gamma$  y el trastuzumab.

Este objetivo puede ser dividido de la siguiente forma:

- Obtención de líneas y poblaciones celulares estables productoras de las moléculas de interés usando vectores comerciales y derivados, con el fin de establecer un punto de referencia sobre el que efectuar la mejora de la producción específica.
- Estudio del efecto en la productividad específica de los elementos genéticos codificados en el vector de expresión que sean susceptibles de mejorar la producción específica gracias a un aumento en la transcripción del gen, en la traducción y secreción de la proteína o en la selección y amplificación de las células transfectadas.
- Desarrollo de un conjunto de herramientas en forma de vectores, líneas celulares y métodos analíticos que permitan realizar una integración dirigida de los vectores de expresión en un punto predeterminado del genoma, de forma que se potencie la productividad de la línea celular y la estabilidad y reproducibilidad de la expresión.
- Estudio de las características productivas de algunas de las líneas obtenidas en un biorreactor.



# CAPITULO 3

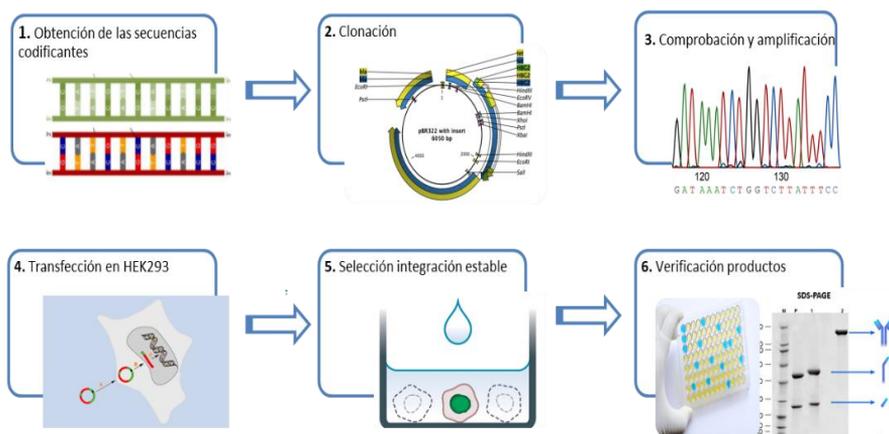
## 3. RESULTADOS (I): CONSTRUCCION DE LINEAS CELULARES PRODUCTORAS DE IFN $\gamma$ Y TRASTUZUMAB

### 3.1 Introducción

Como se ha indicado anteriormente en el Capítulo 2, la obtención de células HEK293 productoras de las proteínas terapéuticas de interés será el primer objetivo del trabajo de tesis. 1. El esquema básico en la obtención de los candidatos será el siguiente:

- 1) Obtención de la secuencia genética que codifica para el producto de interés (ORF, *Open Reading Frame*)
- 2) Clonación de esta secuencia en un vector comercial ampliamente usado que contenga los elementos adecuados para la expresión de la proteína en células de mamífero.
- 3) Amplificación del vector en un hospedador bacteriano mediante transformación y selección de los clones receptores y comprobación de la secuencia correcta de bases mediante secuenciación Sanger.
- 4) Transfección del vector a las células productoras modelo.
- 5) Selección de las células que hayan integrado el vector de forma estable en su genoma.
- 6) Escalado de las células seleccionadas y prueba de expresión de la proteína.

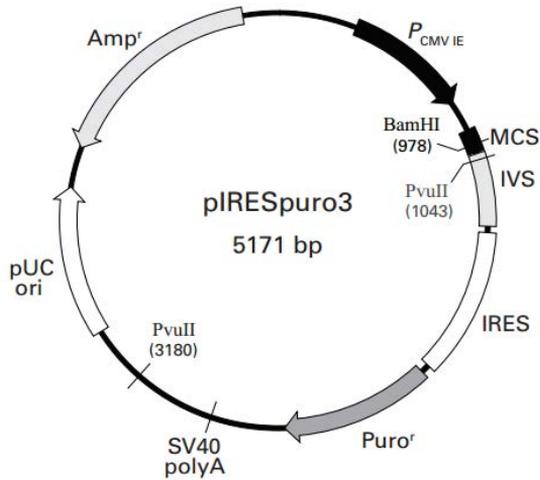
El esquema se encuentra resumido de forma gráfica en la Figura 3.1.A nivel metodológico, se han realizado varias elecciones que afectan a algunos puntos del proceso descrito y que serán usadas a lo largo de todo el trabajo de tesis doctoral.



**Figura 3.1. Esquema para la obtención de poblaciones celulares estables productoras de proteínas terapéuticas.**

En primer lugar, el vector de expresión que se usará para expresar las proteínas recombinantes y que será la base para posteriores mejoras, será el vector comercial pIRESpuo3 (Figura 3.2). Este vector dispone de una parte bacteriana derivada del vector pUC clásico, con un gen de resistencia a Ampicilina y un origen de replicación para *E.coli*, con el fin de trabajar en hospedadores bacterianos para la aplicación de las técnicas de biología molecular. En la parte destinada a células de mamífero, cuenta con un *cassette* de expresión compuesto por los siguientes elementos principales:

- 1) Un promotor de Citomegalovirus con *enhancer* (CMVie)
- 2) Un sitio de clonación múltiple (MCS, *multiple cloning site*) para clonar los genes de interés.
- 3) Un intrón sintético IVS (*Intervining sequence*) que mejora la estabilidad del mRNA<sup>1</sup>.
- 4) Una secuencia IRES (*Internal Ribosome entry site*) para la transcripción encadenada de dos genes<sup>2</sup>.
- 5) Un gen codificante de la enzima puomicin-acetiltransferasa (*pac*), que actúa como marcador de selección confiriendo resistencia al antibiótico eucariota puomicina, utilizado para seleccionar las células transfectadas de forma estable<sup>3</sup>.



**Figura 3.2. Mapa del vector pIRESpuro3, mostrando sus principales elementos.**

El uso de la secuencia IRES es la característica principal de este vector y la razón principal de su elección en el presente trabajo. Esta secuencia permite la traducción de un gen sin la necesidad de que este tenga la modificación Cap en el extremo 5' del mensajero. Esto se consigue gracias a que la secuencia permite el acceso del ribosoma a una zona interna del mRNA codificante, habiendo sido explotado este hecho para expresar simultáneamente dos o más proteínas simultáneamente en el mismo mRNA.

Este hecho presenta importantes ventajas a la hora de seleccionar las células productoras: Dado que el plásmido carece de origen de replicación para células de mamífero, todas las células supervivientes al proceso selectivo han de tener forzosamente integrado en su genoma todo el *cassette* de expresión. Y debido a que la expresión del marcador de selección lleva aparejada la expresión del gen de interés, todas las células de la población, a su vez, son células productoras. Esto permite acortar los tiempos de construcción de las líneas celulares y evita efectos indeseables que ocurren con otro tipo de aproximaciones, como la de usar promotores separados para cada gen (Pudiendo aparecer células resistentes pero no productoras, debido a procesos de represión epigenética<sup>4</sup>) o la de fusionar la proteína de interés con la proteína que confiere resistencia usando péptidos

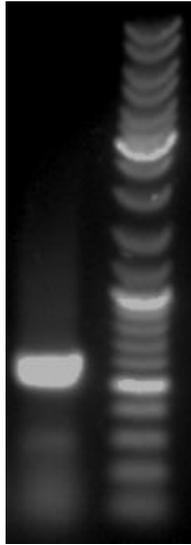
autodigeribles tipo 2A (Con diversos problemas, como peores rendimientos al no procesarse el 100% de las proteínas<sup>5</sup> o los posibles fallos de corte en el péptido que pueden llevar a la aparición de formas de la proteína de interés con secuencia peptídica alterada).

### **3.2 Obtención de las secuencias codificantes.**

La obtención de las secuencias codificantes se ha realizado de forma diferente para cada uno de los productos de interés.

#### **3.2.1 IFN $\gamma$**

La secuencia codificante del IFN $\gamma$  humano ha sido obtenida mediante retrotranscripción del RNA codificante para la proteína seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Como fuente se han usado células de sangre de cordón umbilical de la línea blanca humana, cedidas por el *Banc de Sang i Teixits* de Catalunya. Partiendo de estas células, se ha realizado un aislamiento de mRNA total, seguida de una retrotranscripción para obtener el DNA copia (cDNA). Del cDNA obtenido se ha realizado una amplificación del marco de lectura u ORF del IFN $\gamma$ , usando oligonucleótidos que contenían dianas de restricción adecuadas para la clonación del inserto obtenido directamente en el vector pIRESpuro3. En la figura 3.3 se observa el resultado de la amplificación.



**Figura 3.3. Gel de agarosa mostrando la amplificación del ORF completo del IFN $\gamma$ , humano (Carril derecho, banda aprox. 500bp, tamaño esperado 520bp)**

El material obtenido se clonó directamente en el vector pIRESpuro3, obteniendo el vector pIFN $\gamma$ \_IRES\_puro.

### **3.2.2. Trastuzumab**

La obtención de la secuencia genética que codifica para el Trastuzumab presenta dos retos añadidos a los convencionales para cualquier otra secuencia:

- 1) En primer lugar, y al igual que todas las inmunoglobulinas (Ig), el Trastuzumab es una proteína compuesta por 4 cadenas polipeptídicas de 2 tipos diferentes: Una cadena pesada (HC) de 50 kDa y una cadena ligera (LC de 25 kDa. Con dos unidades de cada una de ellas se forma la forma monomérica del mAb (150kDa), basada en una IgG. El resultado de todo ello es que para obtener una célula productora de un anticuerpo es necesaria la expresión simultánea de dos secuencias genéticas que darán lugar cada una de ellas a una de las cadenas de forma separada para ser posteriormente ensambladas por la célula.
- 2) En segundo lugar, el Trastuzumab es una molécula artificial que ha sido construida mediante un proceso de humanización. (Figura 3.4). Para

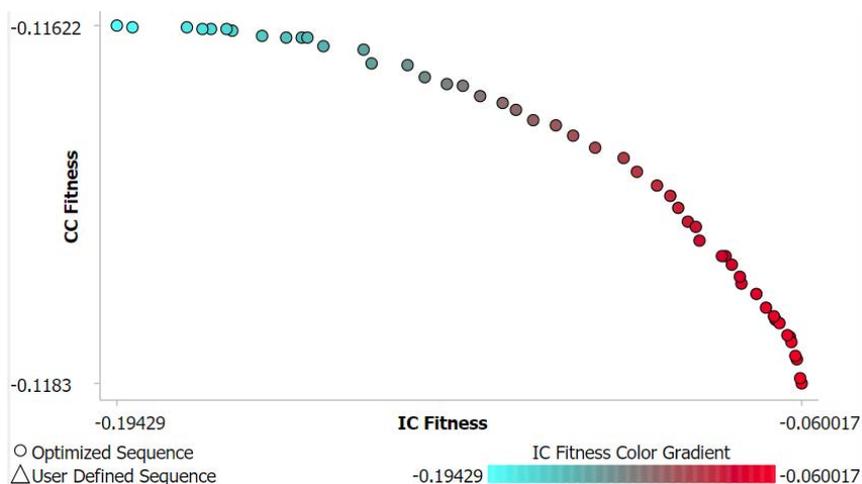
ello, la empresa comercializadora Genentech obtuvo un anticuerpo Anti-HER2 usando tecnología de generación de hibridomas y substituyó toda la parte constante de la IgG de ratón por la de una IgG humana, obteniendo un anticuerpo quimérico. Posteriormente, la parte constante fue modificada mediante técnicas de *CDR grafting* y *re-shapping* con el fin de hacerlo menos inmunógeno, sin renunciar al reconocimiento del antígeno<sup>6</sup>. Como resultado de ello, la secuencia genética es propietaria de la empresa y no está disponible para su amplificación.

Sin embargo, sí que está disponible la secuencia aminoacídica de ambas cadenas del Trastuzumab en la base de datos DrugBank, que contienen información química y bioinformática de centenares de fármacos aprobados por la FDA con el propósito de ayudar a la investigación.

Por ello, es posible obtener una secuencia de DNA codificante para ambas cadenas del Trastuzumab mediante una traducción inversa *In-silico*. Debido a la degeneración del código genético, múltiples codones pueden ser usados para codificar una determinada secuencia, de modo que, para determinar el sesgo codónico más adecuado para la expresión de estas secuencias en células de mamífero se ha usado el software *Codon Optimization On-Line (COOL)* de la Universidad Nacional de Singapur (NUS) <sup>7</sup>

Este software realiza todas las combinaciones posibles de codones para una secuencia proteica determinada y los ordena en función de su *fitness* a la hora de ser expresado en el hospedador deseado. El cálculo de Fitness se realiza teniendo en cuenta dos factores:

- 1) Uso individual de codones (ICU) de cada especie: La secuencia obtenida se adapta teniendo en cuenta los codones preferidos para cada aminoácido que tiene cada especie.
- 2) Contexto de codones (CC): Tiene en cuenta no solo el codón preferido por el hospedador, sino también los codones que inmediatamente preceden o anteceden al mismo, consiguiendo una secuencia más parecida a una secuencia natural de un determinado hospedador.



**Figura 3.4. Secuencias obtenidas mediante COOL para la LC del Trastuzumab, ordenadas según sus índices IC y CC.**

En la figura 3.4 se puede observar una de las salidas gráficas del programa (Correspondiente a la cadena ligera del Trastuzumab) en las cuales se ordenan las secuencias generadas en base a sus índices IC y CC. Para ambas cadenas (HC y LC), se eligieron las secuencias que presentaban la relación más equilibrada de ambos índices, teniendo en cuenta que todas están adaptadas al uso codónico humano.

Una desventaja añadida del uso de una base de datos proteómica para la construcción *in-silico* de una secuencia genética codificante es la ausencia en la misma de un péptido señal para secretar la proteína fuera de la célula (Ya que este es cortado tras la secreción y no se incluyen en la secuencia proteica expuesta en Drugbank). Para terminar la construcción genética, se añadieron, a las secuencias obtenidas, las secuencias de péptidos señales identificados en la bibliografía como altamente eficaces para la secreción de trastuzumab<sup>8</sup>.

Una vez realizada la adaptación, las secuencias se obtuvieron mediante síntesis química realizadas por la empresa Genscript, obteniendo ambas secuencias clonadas en vectores pUC57 y flanqueadas por las dianas necesarias para su

clonación en los vectores que se usaran para su expresión en la línea celular HEK293 (Ver Capítulo 9).

### **3.3 Expresión de IFN $\gamma$**

El vector pIFN $\gamma$ \_IRES\_puro obtenido anteriormente fue transfectado a las células HEK293 mediante el sistema K2 (Biotex), basado en la transfección mediada por complejos lipídicos. Las células fueron seleccionadas usando una concentración de puomicina de 2 $\mu$ g/mL, previamente determinada como la concentración mínima para matar al 100% de células HEK293 no transfectadas en menos de 48h (Anexo III). Tras comprobarse la muerte en el pocillo de células no transfectadas, las células transfectadas supervivientes fueron escaladas 1 semana después de la transfección a T-flask de 25cm<sup>2</sup>, momento en el que se ensayó la producción y secreción de IFN $\gamma$  en el sobrenadante del cultivo, mediante un test basado en ELISA, obteniendo un resultado positivo (Fig. 3.5).

Una vez confirmada que la población obtenida era productora de la molécula de interés, se realizó una adaptación de la misma al cultivo en suspensión, por ser esta la forma preferida de producción que permite, tanto llegar a productividades volumétricas más elevadas, como una manipulación más simple del cultivo para su escalado y la recuperación del producto. Una vez conseguida la adaptación, se realizó una cinética de crecimiento y acumulación de producto en shake flask de 100mL, que se presenta en la figura 3.6, determinándose los parámetros cinéticos y productivos de la población celular obtenida, que se resumen en la tabla 5.



**Figura 3.5. Placa ELISA positiva para diversas muestras de IFN $\gamma$**

Como se observa, el comportamiento cinético de las células es similar al de la línea parental HEK293, llegando a similares concentraciones de células viables y con un tiempo de proceso similar de 162h en el pico de máxima densidad celular (MCD). El título de IFN $\gamma$  alcanzado es de 2,5 $\mu$ g/mL.

**Tabla 5. Parámetros cinéticos y productivos**

Célula/Plásmido	tD (h)	Productividad específica (pg/cel/día)	Título (mg/L)
HEK293 wt	25h	NA	NA
HEK293/pIFN $\gamma$ _IRESpuo	28h	0,11	2,5

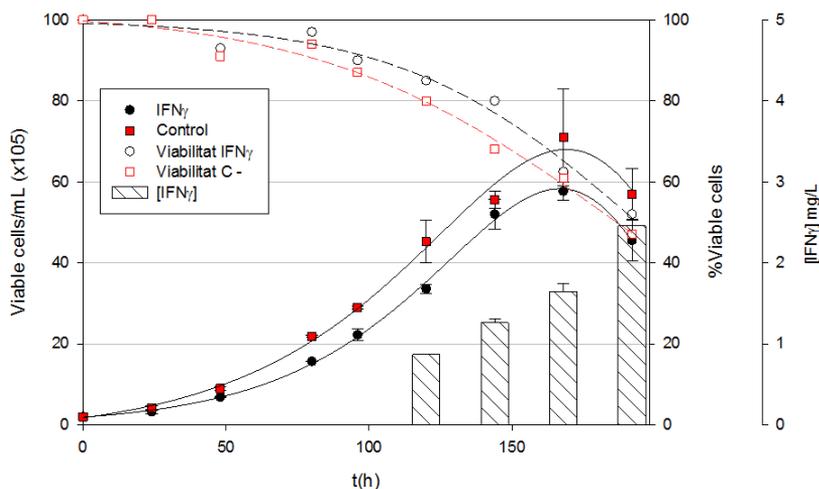


Figura 3.6. Cinética de crecimiento y producción de las células HEK293 parentales y productoras de IFN $\gamma$

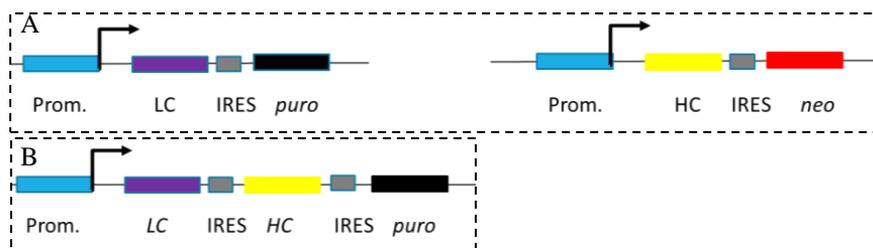
### 3.4 Expresión de Trastuzumab

#### 3.4.1. Construcción de sistemas de expresión

Debido a las características antes mencionadas (necesidad de expresar dos genes simultáneamente) ha sido necesario explorar varias estrategias para determinar el sistema de expresión óptimo para producir el mAb en una única línea de las células HEK293. Las estrategias disponibles se basan en A) Co-transfectar dos vectores bicistrónicos cada uno con una cadena y un marcador de selección diferente para cada vector, o B) construir un vector tricistrónico que exprese 3 genes (HC, LC y marcador de selección) desde un mismo mRNA o C) Expresar los genes desde promotores diferentes en el mismo vector, usando un mismo marcador para los dos plásmidos o uno diferente para cada uno. La estrategia C se descartó ya que no era necesario el uso de vectores con IRES y podía conllevar problemas de silenciamiento (represión epigenética) de alguno o de los dos promotores, conllevando ratios LC:HC descompensados<sup>9</sup>.

Las estrategias finalmente evaluadas se resumen en la figura 3.7. Para la estrategia B) se realizó la clonación de la cadena pesada HC en el vector

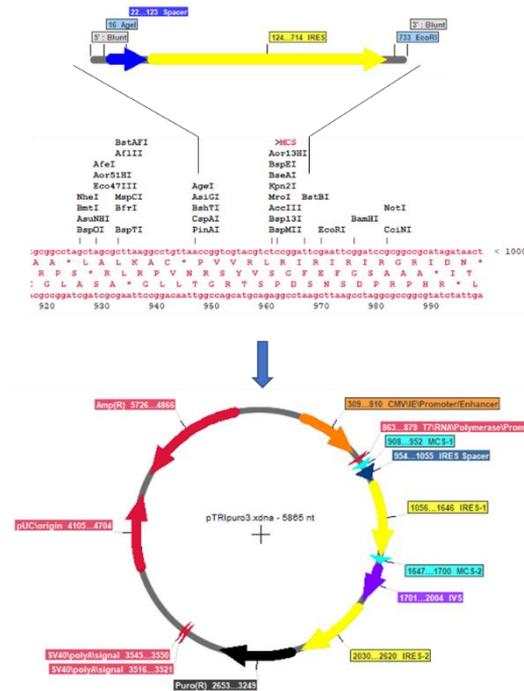
pIRESpuro3 y de la cadena ligera LC en el vector pIRESneo3, siendo este un vector equivalente al pIRESpuro3 en todos sus elementos excepto en el



**Figura 3.7. Estrategias de expresión del trastuzumab: Dos vectores, cada uno con una cadena del mAb unida mediante IRES a la expresión de un marcador de selección diferenciado (A). Vector de expresión tricistronico con resistencia a puromicina (B)**

marcador de selección, que en este caso usa el gen neoR, confiriendo resistencia al antibiótico G418. Se obtuvieron los vectores pLC\_IRESneo y pHC\_IRESpuro.

Para la estrategia C) fue necesaria la construcción de un vector tricistronico derivado del pIRESpuro3 que permitiera la clonación de las dos cadenas. Para ello, se diseñó una secuencia sintética denominada IRES1PS, que consta de un espaciador sintético equivalente al intrón IVS y otra secuencia IRES, todo ello flanqueado por las dos dianas más internas presentes en el MCS del vector pIRESpuro3. Al clonar el fragmento, se obtiene un vector con dos MCS que permite la clonación de dos genes de interés acoplados a la expresión del marcador de selección. En la figura 3.8 se puede observar un esquema de la construcción del vector tricistronico. El vector se ha denominado pTRIPuro.



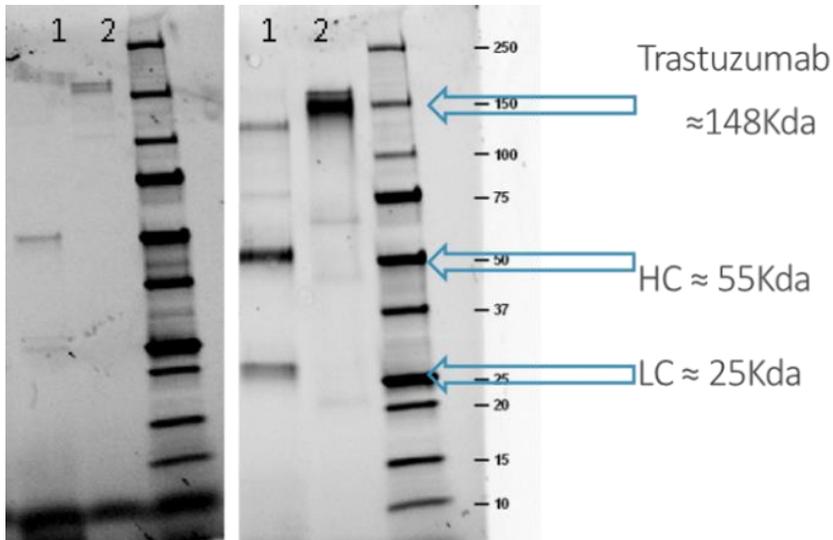
**Figura 3.8. Esquema de la construcción del vector tricistrónico pTRI\_puro3 a partir de una secuencia sintética IRES1PS y del vector pIRES\_puro3**

Una vez obtenido este vector, se realizó la clonación de la cadena ligera en el primer MCS y de la cadena pesada en el segundo, obteniendo el vector pTRI\_TRA\_puro.

### 3.4.2. Evaluación de las estrategias de expresión

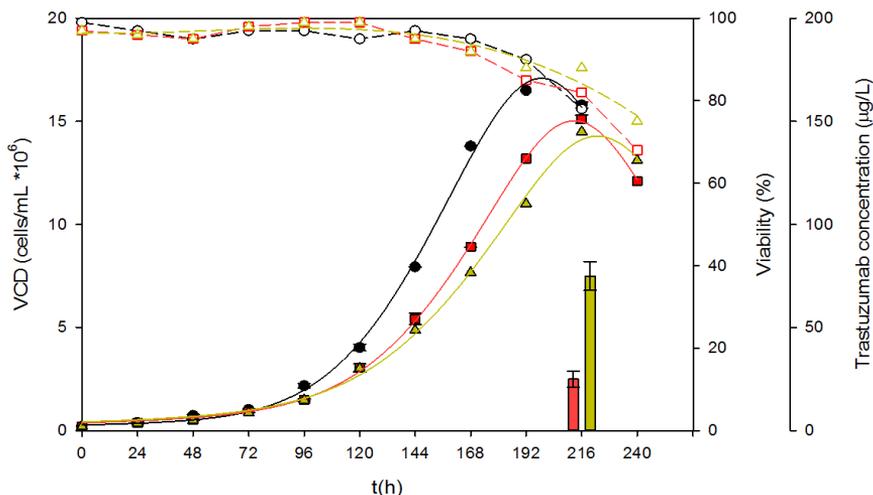
Una vez obtenidos los vectores, se realizó su transfección a las células HEK293 de manera análoga a la realizada con la construcción con IFN $\gamma$ . Para el caso de la estrategia B), que implica la co-transfección y co-selección de dos vectores con dos marcadores de selección, se usó como condición selectiva 2 $\mu$ g/mL de puomicina y 1mg/L de G418, tras realizar una curva de muerte para este antibiótico (Anexo III). Para el caso del vector tricistrónico, se usaron 2 $\mu$ g/mL de puomicina. Una vez seleccionadas y escaladas las células, se comprobó la correcta expresión del anticuerpo en ambos casos mediante un test ELISA desarrollado específicamente para detectar trastuzumab (Capítulo 9), así como

mediante geles de proteínas SDS-PAGE, comprobándose que ambas estrategias daban lugar a un anticuerpo con el tamaño esperado (150 Kda, fig. 3.9) y que reconocía su antígeno (HER2).



**Figura 3.9. Geles SDS-PAGE mostrando el tamaño de las cadenas polipeptídicas del trastuzumab producido en células HEK293 usando la estrategia de dos vectores bicistronicos (Izquierda) o un solo vector tricistronico (Derecha) en condiciones desnaturizantes reductoras (1) y no reductoras (2).**

Con el fin de caracterizar la estrategia más ventajosa de cara a la producción de trastuzumab, ambas poblaciones celulares fueron adaptadas al cultivo en suspensión y se realizó una curva de crecimiento en las condiciones selectivas para cada población celular (Fig. 3.10.)



**Figura 3.10. Cinética de crecimiento y producción de las células HEK293 productoras de trastuzumab usando la estrategia de dos vectores bicistronicos (■) o un solo vector tricistronico (▲)**

Como se observa, la estrategia que emplea un vector tricistronico consigue multiplicar por 3 la producción específica del producto, con  $3 \times 10^{-3}$  pg/cel/dia, en comparación con los  $1 \times 10^{-3}$  pg/cel/dia alcanzados por las células construidas mediante la estrategia de la co-transfección de dos vectores. Dado que las densidades celulares y los tiempos de duplicación de ambos tipos celulares son similares, este aumento de productividad específica se traslada directamente a los títulos de producto alcanzados, con  $25 \mu\text{g/L}$  en el caso de la estrategia A) y  $75 \mu\text{g/L}$  en el caso de la estrategia B). Debido a este hecho, se ha seleccionado la estrategia del vector tricistronico para ultteriores estudios llevados a cabo durante el presente trabajo. En la tabla 6 se presentan los principales parámetros cinéticos y productivos.

**Tabla 6. Parámetros cinéticos y productivos**

Célula/Plásmido	tD (h)	Productividad específica (pg/cel/dia)	Título (mg/L)
HEK293 wt	25h	NA	NA
HEK293/pLC_IRESneo pHC_IRESpuro	35h	$0,45 \times 10^{-3}$	0,025
HEK293/pTRI_TRApuro	36h	$1,47 \times 10^{-3}$	0,075

### 3.5 Conclusiones

Durante el presente capítulo se ha cumplido con el objetivo de obtener poblaciones celulares estables productoras de las proteínas terapéuticas elegidas como modelos. Se ha conseguido expresar correctamente moléculas funcionales que son reconocidas en ensayos inmunológicos y se han desarrollado las técnicas de biología molecular, así como las técnicas analíticas encaminadas a la detección del producto de interés necesarias para llevar a cabo el resto del trabajo de tesis doctoral. Además, se han caracterizado las poblaciones celulares obtenidas en términos cinéticos y productivos.

Los datos obtenidos serán la base para tratar de mejorar las cifras de productividad específica y título volumétrico en los siguientes capítulos del presente trabajo. Una vez establecida metodología para la obtención de las líneas celulares productoras y determinados los títulos y productividades que serán el punto de partida del presente trabajo de tesis doctoral, se comenzará en los subsiguientes capítulos a investigar y desarrollar las diferentes metodologías que permitan un aumento de la productividad específica de los biocatalizadores que se vayan construyendo. En el siguiente capítulo, se explorarán promotores y péptidos señal para mejorar la producción específica de las células productoras de las moléculas de interés.

### 3.6 Referencias

1. Huang, M. T. & Gorman, C. M. Intervening sequences increase efficiency of RNA 3' processing and accumulation of cytoplasmic RNA. *Nucleic Acids Res.* **18**, 937-47 (1990).
2. Jackson, R. J., Howell, M. T. & Kaminski, A. The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation. *Trends Biochem. Sci.* **15**, 477-483 (1990).
3. PAIK, S.-Y., SUGIYAMA, M. & NOMI, R. Isolation and properties of a puromycin acetyltransferase from puromycin-producing *Streptomyces alboniger*. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **38**, 1761-1766 (1985).
4. Mariati, Yeo, J. H. M., Koh, E. Y. C., Ho, S. C. L. & Yang, Y. Insertion of core CpG island element into human CMV promoter for enhancing recombinant protein expression stability in CHO cells. *Biotechnol. Prog.* **30**, 523-534 (2014).
5. Liu, Z. *et al.* Systematic comparison of 2A peptides for cloning multi-

- genes in a polycistronic vector. *Sci. Rep.* **7**, 2193 (2017).
6. Carter, P. *et al.* Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 4285-9 (1992).
  7. Chin, J. X., Chung, B. K.-S. & Lee, D.-Y. Codon Optimization OnLine (COOL): a web-based multi-objective optimization platform for synthetic gene design. *Bioinformatics* **30**, 2210-2212 (2014).
  8. Haryadi, R. *et al.* Optimization of heavy chain and light chain signal peptides for high level expression of therapeutic antibodies in CHO cells. *PLoS One* **10**, e0116878 (2015).
  9. Ho, S. C. L. *et al.* Control of IgG LC:HC ratio in stably transfected CHO cells and study of the impact on expression, aggregation, glycosylation and conformational stability. *J. Biotechnol.* **165**, 157-166 (2013).

# CAPITULO 4

## 4. RESULTADOS (II): ELEMENTOS GENÉTICOS OPTIMOS PARA LA EXPRESIÓN Y SECRECIÓN

### 4.1. Introducción

Si bien la correcta expresión de la proteína viene determinada en gran parte por la secuencia de aminoácidos de la misma y por la capacidad de plegamiento y secreción que puedan tener las diferentes células hospedadoras, el nivel de productividad de una línea o población celular clonal determinada está influido por multitud de factores, que se detallan a continuación:

- 1) Secuencia: Los niveles de expresión de una proteína determinada pueden tener grandes variaciones en función de la secuencia usada para codificarla, debido al uso codónico de cada organismo. Por esta razón, una correcta selección de la secuencia a expresar es determinante en la producción del candidato<sup>1</sup>. Las herramientas bioinformáticas actuales permiten una rápida y certera elección de la secuencia sin incurrir en costosos cribajes o *screenings*, aunque es deseable realizar experimentos preliminares con varias secuencias alternativas.
- 2) Elementos del vector de expresión: Los diferentes elementos codificados en el vector de expresión tienen un fuerte impacto en los niveles de producción de una proteína determinada, dado que son los responsables de eventos clave, como los niveles de transcripción del gen de interés (Determinados por el promotor y *enhancers* asociados)<sup>2</sup>, la estabilidad del mRNA mensajero (intrones sintéticos), la translocación y secreción de la proteína (péptidos señal)<sup>3</sup> o la selección de las células más productoras (marcador de selección).
- 3) Lugar de integración en el genoma: El contexto genómico en el que se encuentre la construcción genética (transgen) tiene un fuerte impacto en los niveles de expresión de la proteína recombinante y la estabilidad de dicha expresión<sup>4</sup>. La construcción de cepas con transgenes integrados en

zonas de alta expresión y estabilidad (*hotspots*) es considerada ventajosa en la industria farmacéutica por motivos, no solo productivos, sino también regulatorios.

- 4) Número de copias del transgen: Se trata de un factor discutible y muy dependiente de cada caso, ya que están descritos estudios a favor<sup>5</sup> y en contra<sup>6</sup> de la integración de múltiples copias del gen de interés. Aunque, en principio sería deseable un mayor número de copias para maximizar la expresión, también se han descrito problemas de estabilidad de la expresión en copias múltiples.

Como se ha detallado anteriormente, el vector de expresión utilizado contiene una serie de elementos, cada uno de los cuales tiene un papel específico en los diferentes procesos celulares que conforman la expresión de la proteína recombinante. Durante el presente capítulo se explorarán diferentes elementos del vector de expresión destinados a mejorar la transcripción y traducción y secreción de la proteína (Promotores y péptidos señal) usando eGFP como proteína modelo. Los mejores elementos identificados usando la proteína modelo serán usados para la expresión de las proteínas de interés (IFN $\gamma$  y Trastuzumab) para verificar su efecto en la productividad específica y volumétrica.

## **4.2 Promotores**

El promotor está compuesto por una secuencia específica localizada justo donde se encuentra el punto de inicio de la transcripción del DNA y contiene la información necesaria para activar o desactivar el gen que regula.

Debido a su función a la hora de iniciar y regular la transcripción de un gen, el estudio de los promotores es de gran interés evolutivo, así como en campos como la biomedicina y las terapias genéticas.

Asimismo, a la hora de realizar la expresión de proteínas recombinantes en un hospedador determinado, la elección del promotor correcto tiene un impacto importante en el resultado final productivo del sistema. Debido a ello, hay numerosos estudios centrados en el rendimiento de los diferentes promotores en diversas líneas celulares eucarióticas, como la línea celular CHO, las células de insecto, hepatomas y alguno en células HEK293.

No obstante, aunque a grandes rasgos se pueden identificar unas características comunes entre los diferentes promotores existentes (Tabla 1), existen divergencias en los resultados obtenidos en los diferentes trabajos. Por esta razón, es recomendable en todo proceso de construcción de líneas celulares realizar una evaluación de diversos promotores para aplicar los que ofrezcan los mejores resultados con la combinación de línea celular hospedadora, proteína y marcador de selección a utilizar.

**Tabla 1: Promotores más usados para la expresión de proteínas recombinantes en células de mamífero y algunas de sus características.**

Promotor	Descripción	Regulación	Consideraciones adicionales
CMV	Promotor de Citomegalovirus, expresión fuerte en células de mamífero	Constitutiva	Puede silenciarse en algunas líneas celulares
EF1 $\alpha$	Promotor del factor humano 1-alfa, expresión fuerte en células de mamífero	Constitutiva	Expresión consistente entre distintas líneas celulares
SV40	Promotor del virus simio SV40	Constitutiva	Puede incluir un <i>enhancer</i>
PGK1	Promotor de la fosfoglicerinato kinasa,	Constitutiva	Resistente al silenciamiento mediante metilación o desacetilación
UBC	Promotor del gen de la Ubiquitina C humana	Constitutiva	?
$\beta$ -actina humana	Promotor del gen de la $\beta$ -actina humana	Constitutiva	Ubiquitous. Chicken version is commonly used in promoter hybrids.
CAG	Promotor híbrido, expresión fuerte	Constitutiva	Contiene el promotor de la $\beta$ -actina, el <i>enhancer</i> del promotor CMV y otros elementos provenientes de la beta-globina de conejo

#### 4.2.1 Expresión de eGFP bajo el control de los diferentes promotores

De los promotores descritos en la tabla 6, se han seleccionado 3 para realizar una prueba de expresión de eGFP en la línea celular HEK293. Estos promotores son el CMV, el EF-1 $\alpha$  y el CAG. Junto con el SV40, son los 3 promotores de mayor uso en la producción de proteínas recombinantes en células de mamífero, dado que su expresión es, generalmente, fuerte. La selección de estos tres promotores

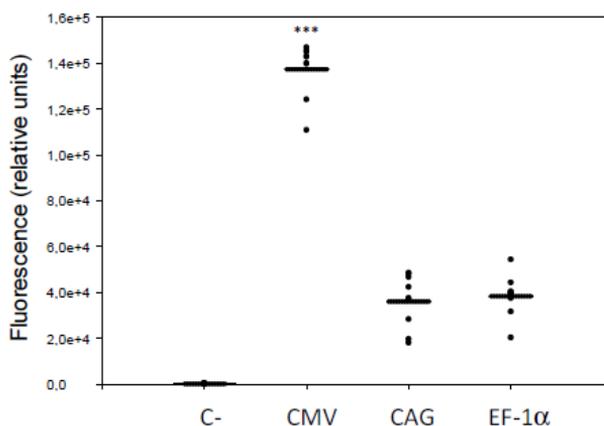
se ha debido a sus diferentes características (Posible silenciamiento, estabilidad en la expresión, etc.) y a la posibilidad de acceder a sus secuencias en el presente trabajo.

La expresión se ha evaluado de forma transiente, proceso mediante el que se transfecta una cantidad determinada de células con el DNA y se evalúa subsiguientemente la expresión de la proteína en toda la población transfectada, sin recurrir a su estabilización en el genoma de la célula. Para dicha prueba, se han generado 3 construcciones basadas en el vector pCMV\_eGFP\_puro3, sobre el que se ha realizado el cambio de la secuencia del promotor CMV por las otras secuencias que se deseaban probar mediante técnicas de biología molecular estándar (Ver Capítulo 8. Materiales y métodos). En la figura 4.1 se observan las 3 construcciones obtenidos y sus principales elementos.



**Figura 4.1.** Estructura de los vectores construidos para la prueba de promotores.

Tras la transfección de los distintos vectores a las células, la eficiencia de cada uno de ellos se ha determinado en función de la fluorescencia media de las poblaciones celulares analizadas mediante Citometría de flujo (FACS, *Fluorescent activated cell sorting*). En este análisis, las células muertas, así como las células no transfectadas, fueron excluidas del recuento para evitar su influencia en los resultados finales. Los resultados a punto final (24h post-transfección), se pueden observar en la figura 4.2.



**Figura 4.2. Expresión transiente de eGFP en células HEK293: Influencia de los distintos promotores probados.**

Como se puede observar, en este caso resulta claro que el promotor CMV resulta el más eficaz para la expresión de proteínas recombinantes en HEK293, con  $1,37 \pm 0,12 \times 10^5$  rfu/cell, seguido por el EF-1α ( $0,38 \pm 0,09 \times 10^5$  rfu/cell,) y el CAG ( $0,36 \pm 0,12 \times 10^5$  rfu/cell,.), resultado que está en consonancia con la literatura revisada.

Dado que el vector incorporaba también la resistencia a puromicina, se decidió generar una cepa estable de cada promotor. Por ello, 48h post-transfección, se recambió el medio completo por medio selectivo con puromicina a  $2 \mu\text{g/mL}$ . Solo en el caso de las células transfectadas con el vector que usaba el promotor CMV fue posible la selección de una población de células resistentes, siendo toda la población fluorescente. Dado que ambos genes (eGFP y *pac*) se encuentran en el mismo transcrito o mRNA y, por tanto, bajo el control del mismo promotor, la fuerza del mismo tiene en este caso una importancia no solo en la productividad de la línea o población celular seleccionada, sino también en las posibilidades de generar líneas celulares estables. A su vez, este hecho tiene un efecto indirecto en la productividad, debido al concepto de astringencia del marcador de selección, que será revisado en detalle en el Capítulo 5 de este trabajo de tesis.

### 4.3 Péptidos señal

Como se ha comentado anteriormente, entre las principales ventajas de las células de mamífero se encuentra el hecho de que poseen una avanzada maquinaria de secreción. Esto garantiza la producción de las proteínas recombinantes de interés en forma soluble y las sitúa en el medio extracelular en el que se desarrollan los cultivos celulares, lo que resulta muy favorable para los subsiguientes pasos de *downstream*, al evitar complejos procesos de interrupción y purificación.

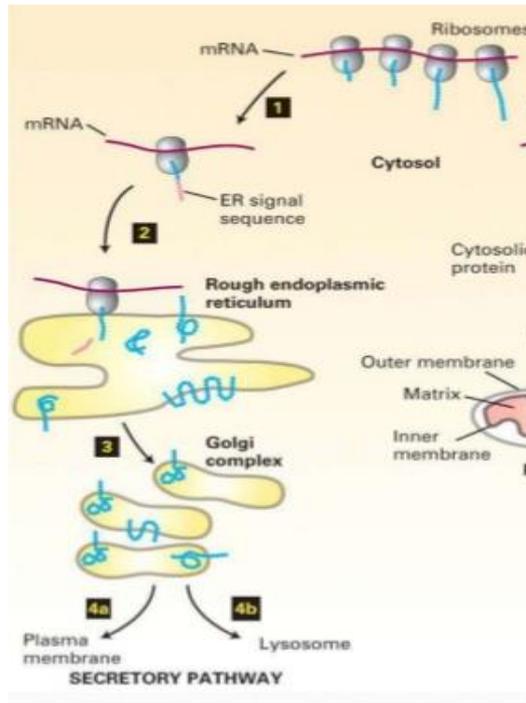
Generalmente, las proteínas secretadas por los organismos superiores suelen seguir dos rutas diferentes:

- 1) Secreción clásica o dependiente del Retículo endoplasmático(RE)/Golgi<sup>7</sup>: Depende de la presencia de un péptido señal en la proteína secretada, la cual será translocada al RE y seguirá los procesos característicos de las vías secretoras hasta su salida de la célula
- 2) Secreción no-clásica o independiente del RE/Golgi<sup>8</sup>: También conocida como UPS (*Unconventional protein secretion*), puede ser mediada o no por péptidos señal, pero no usa la vía RE/Golgi para alcanzar el espacio extracelular.

En los eucariotas superiores, la vía clásica es la responsable de la secreción de la mayoría de las proteínas. Asimismo, desde un punto de vista industrial, esta vía es la aprovechada para secretar en grandes cantidades las proteínas de interés a producir<sup>9</sup>. A grandes rasgos, la vía clásica para la secreción de proteínas en células de mamífero consta de los siguientes pasos (Fig 4.3):

- 1) La proteína, que consta de un péptido señal en su extremo N-terminal, es sintetizada en los ribosomas. Conforme crece la cadena polipeptídica, la región del péptido señal conduce la translocación de la misma hacia la membrana del RE.
- 2) Una vez sintetizada la pre-proteína, una endopeptidasa separa el péptido señal, produciendo una proteína madura que queda dentro de una vesícula secretoria.

- 3) La vesícula es procesada a través del aparato de Golgi, lugar en donde se producen modificaciones post-traduccionales, como las glicosilaciones.
- 4) Finalmente, la vesícula se fusiona con la membrana celular y la proteína es secretada al medio extracelular.



**Figura 4.3. Ruta de secreción clásica de las proteínas**

Que una proteína sea direccionada o no hacia la ruta de secreción depende de la presencia del péptido señal. El péptido señal es una secuencia corta, de entre 16 y 30 residuos, presente en el extremo N-terminal de la pre-proteína. Su característica estructural definitoria es la presencia de una serie continuada de aminoácidos hidrofóbicos (Entre 5 y 16 residuos) que provocan una tendencia hacia la formación de una alfa-hélice que promovería la translocación de la proteína.

La correcta elección del péptido señal tiene un gran impacto en las características productivas de una línea celular determinada, como demuestran los diferentes estudios a este respecto<sup>10,11</sup>. Existen números artículos que prueban diferentes

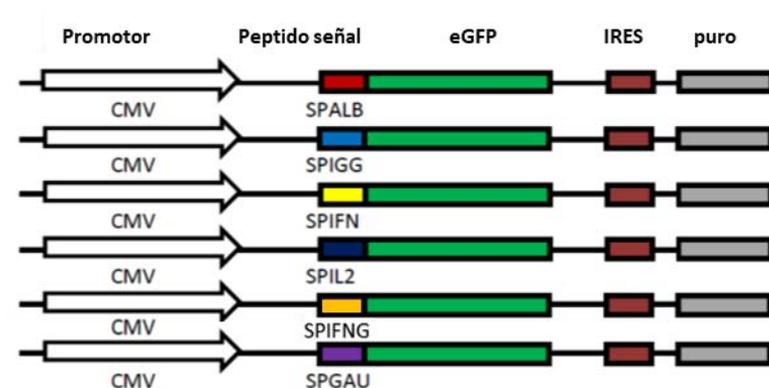
péptidos señal para secretar la misma proteína, especialmente en células CHO productoras de mAbs, el caso que está más estudiado<sup>12,13</sup>.

Normalmente, dado que la mayoría de las proteínas recombinantes terapéuticas tienen su propio péptido señal, éste no suele ser modificado para mejorar la secreción de la proteína. No obstante, dado que, según los estudios anteriormente citados, las diferencias de productividad pueden ser grandes y que, además, existe poca o ninguna literatura relacionada (acerca del desempeño de diferentes péptidos señales en HEK293) se ha considerado relevante verificar el efecto del péptido señal en la producción y secreción de eGFP en esta línea celular.

#### **4.2.2. Secreción de eGFP mediante el uso de diferentes péptidos señal**

Para este estudio, se ha realizado la fusión en marco del extremo N-terminal de la eGFP con los diferentes péptidos señal escogidos para su evaluación: Péptidos señal de Albúmina humana, SPALB; Inmunoglobulina G, SPIGG; Interferón alfa2, SPIFNA; Interferón gamma, SPIFNG; Interleukina-2, SPIL2 y Luciferasa de *Gaussia princeps*, SPGAU. Estos péptidos han sido seleccionados dado que pertenecían a proteínas que alcanzan grandes niveles de secreción (SPALB, SPIGG), son usados industrialmente de manera habitual (SPIL2), se ha encontrado información bibliográfica acerca de su efectividad (SPGAU) o bien estaban fácilmente disponibles para el investigador (SPIFNA y SPIFNG).

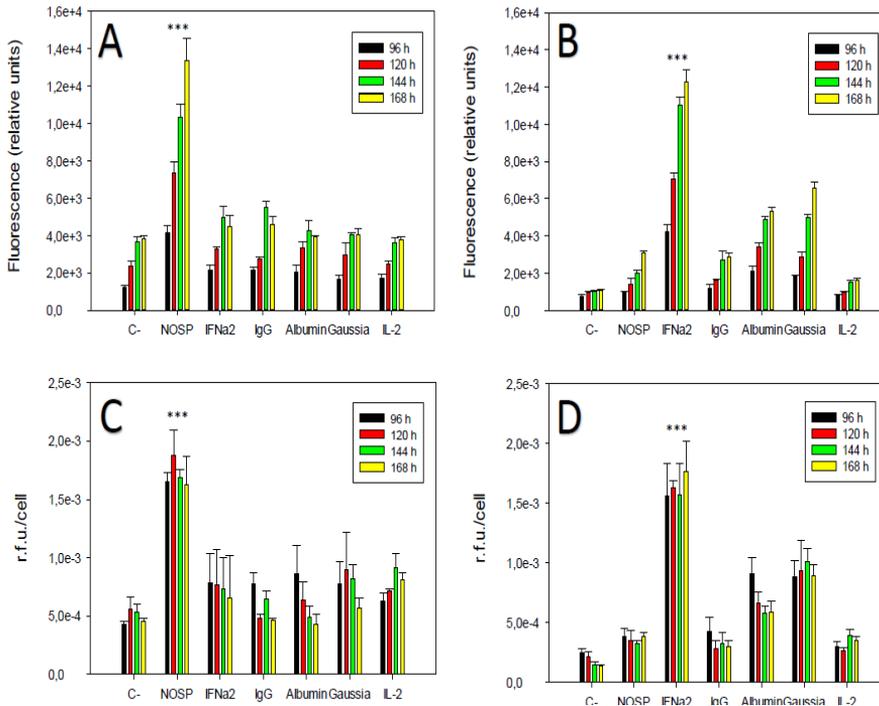
La fusión en marco de lectura se ha realizado mediante PCR solapante (*Splicing by overlap-extension* PCR, ver Capítulo 9) respetando el extremo N-terminal de la eGFP. Los productos de PCR obtenidos han sido clonados directamente en el vector pIRESpuro3. En la figura 4.4 se pueden observar la fusión de los diferentes péptidos señal, junto con sus características hidrofóbicas (A) y los vectores generados (B).



**Figura 4.4. Estructura de los vectores construidos para la prueba de péptidos señal.**

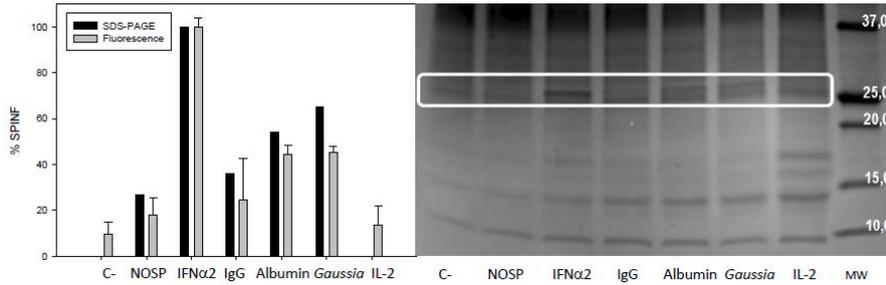
El experimento se ha realizado mediante transfección estable, seleccionándose todas las líneas celulares con la misma cantidad de puromicina. Las poblaciones seleccionadas han sido escaladas y adaptadas al cultivo en suspensión y se ha realizado una cinética de crecimiento, extrayéndose células para determinar el recuento celular, la viabilidad y la fluorescencia intra y extracelular mediante fluorimetría. Los resultados extracelulares han sido posteriormente reconfirmados mediante SDS-PAGE.

Los resultados del experimento pueden observarse en la figura 4.5. En cuanto a la fluorescencia intracelular, se observa como las células transfectadas con la eGFP sin péptido señal son las que presentan una mayor intensidad de fluorescencia, tanto en términos normalizados como absolutos, como era de esperar. En el resto de casos, se observa una fluorescencia que está en los mismos niveles que los del control no transfectado. En cuanto a la fluorescencia extracelular, la mayor cantidad de eGFP secretada al sobrenadante se consigue mediante la fusión con el péptido señal del  $\text{IFN}\alpha 2$  ( $1,76 \pm 0,26 \times 10^{-3}$  rfu/cell), seguido de la fusión con Luciferasa de *Gaussia*, IFNG y Albumina ( $0,89 \pm 0,10 \times 10^{-3}$  y  $0,58 \pm 0,10 \times 10^{-3}$  rfu/cel, respectivamente) a las 168h de cultivo (punto de máxima producción)



**Figura 4.5. Fluorescencia volumétrica Intracelular (A) y extracelular (B) medida mediante espectrofluorimetría en los cultivos de células HEK293 expresando eGFP fusionada a los distintos péptidos señal. Fluorescencia intracelular (C) y extracelular (D) normalizada por el número de células.**

Los resultados muestran una secreción de eGFP al menos 2 veces superior al segundo péptido señal más eficiente (SPGAU). Para confirmar los resultados y descartar el posible impacto que la fusión del péptido señal hubiese podido tener sobre la estructura de la eGFP (y, por tanto, sobre su nivel de fluorescencia), se realizó un análisis mediante SDS-PAGE del sobrenadante de todos los cultivos para determinar los niveles de producción mediante densitometría. El resultado, así como su comparación con los resultados obtenidos mediante espectrofluorimetría, se puede observar en la figura 4.6, que muestra la concordancia de ambos valores.



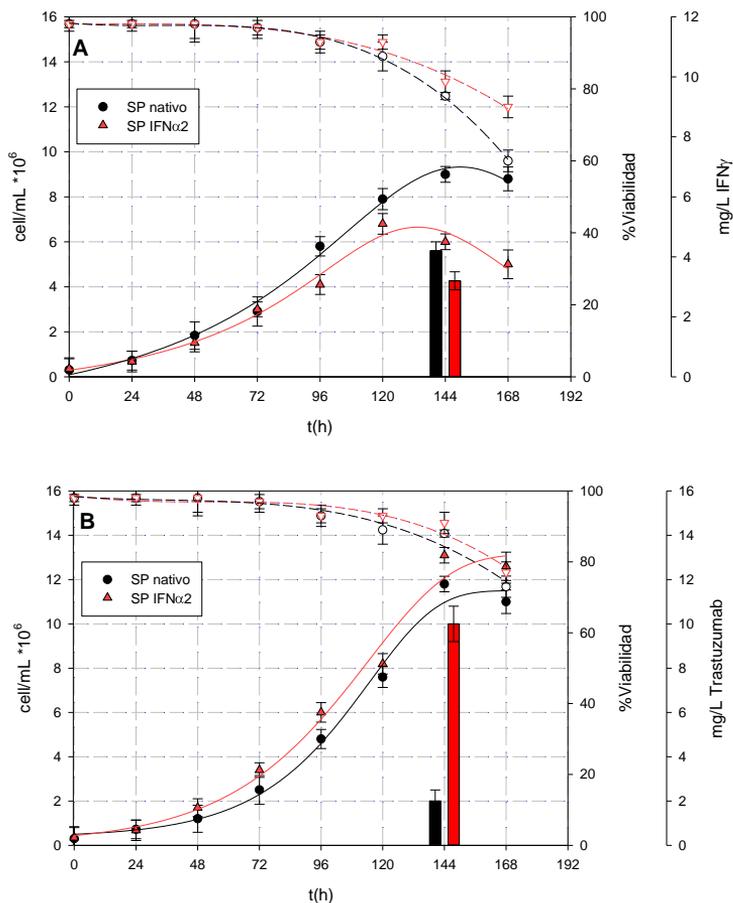
**Figura 4.6. Comparación de los niveles de fluorescencia y de la intensidad de la banda de eGFP en geles SDS-PAGE, tomando como 100% la intensidad de SPIFNA.**

El péptido señal del IFN $\alpha$ 2 es el candidato seleccionado con el fin de comprobar su efecto en la producción de moléculas de interés terapéutico.

#### **4.4 Aplicación del péptido señal SPIFNA en la producción de IFN $\gamma$ y Trastuzumab**

Con el fin de validar la aplicabilidad de los elementos anteriormente seleccionados, se decidió realizar la fusión de ambas moléculas de interés terapéutico con el péptido señal del IFN $\alpha$ 2 mediante las mismas técnicas de PCR solapante previamente utilizadas, resultando en la sustitución de los péptidos señal propios de cada molécula (Péptido señal natural en el caso del IFN $\gamma$  y péptido señal optimizado en el caso del Trastuzumab). En el caso del Trastuzumab, se utilizó el mismo péptido señal (SPIFNA) en ambas cadenas del anticuerpo (Originalmente, se usaban 2 diferentes según la descripción bibliográfica). Los productos se clonaron en el vector pIRESpuro3 (en el caso del IFN $\gamma$ ) o en el vector tricistrónico pTRIpuro3 (caso de las dos cadenas del Trastuzumab), estando todas las construcciones bajo el control del promotor CMV.

Con los constructos obtenidos, se generaron líneas estables productoras, siguiendo los métodos ya descritos, y se realizó una cinética comparativa para establecer los niveles de producción volumétrica de cada producto. Los resultados se detallan en la figura 4.7.



**Figura 4.7. Curvas de crecimiento y concentración de producto en las líneas transfectadas con IFN $\gamma$  (A) y Trastuzumab (B), usando el péptido señal de IFN $\alpha$ 2 (Negro) o el péptido señal original (Rojo)**

El resultado obtenido es diferente según la molécula problema expresada. En el caso del IFN $\gamma$  (Fig. 4.7.A), se observa como la concentración volumétrica de producto es inferior, de  $3,2 \pm 0,4$  mg/L respecto a  $4,2 \pm 0,3$  mg/L, en el caso de la población celular que expresa la molécula fusionada con el péptido señal de IFN $\alpha$ 2. Dado que la cinética de crecimiento muestra una menor densidad celular en este último caso, la producción específica de ambas poblaciones resulta ser similar ( $0,13$  pg/cel/día), demostrando una eficacia similar a nivel molecular.

En el caso del Trastuzumab se observa, sin embargo, un comportamiento completamente opuesto, consiguiendo multiplicar por 5 la producción

volumétrica del cultivo ( $2\pm 0,8\text{mg/L}$  respecto a  $0,4\pm 0,5\text{mg/L}$ ) y aumentar 4 veces la productividad volumétrica de la población celular productora ( $0,060\text{pg/cel/día}$  vs  $0,06\text{pg}0156\text{pg/cel/día}$ ). Los valores se muestran en la tabla 2

**Tabla 2: Valores de crecimiento y productividad específica**

Célula/Plásmido	tD (h)	Productividad específica (pg/cel/día)	Título (mg/L)
IFN $\gamma$ SP nativo	30h	0,13130	4,2 $\pm$ 0,3
IFN $\gamma$ SP_IFN $\alpha$ 2	32h	0,13130	3,2 $\pm$ 0,4
Trastuzumab SP nativo	31h	0,060156	0,4 $\pm$ 0,05
Trastuzumab SP_IFN $\alpha$ 2	30h	0,060	2 $\pm$ 0,8

#### 4.5 Conclusiones

A lo largo del presente capítulo se han estudiado dos de los principales elementos que determinan los niveles de producción de una proteína recombinante en un cultivo celular: El promotor y el péptido señal.

La importancia de los promotores en la producción de las líneas celulares es un fenómeno muy estudiado y descrito en numerosas publicaciones<sup>14-16</sup>. Generalmente, es aceptado que es necesario, como primer paso en el desarrollo de una nueva cepa productora, probar diferentes promotores para evitar problemas de productividad. Las pruebas no solo deben estar destinadas a comprobar la efectividad de cada promotor, sino también la estabilidad de la expresión (debida a factores epigenéticos como la metilación o la acetilación, ampliamente descritos<sup>17</sup> como responsables de la represión de la expresión de diversas proteínas recombinantes) así como por el posible efecto de los mismos a la hora de finalizar con éxito la construcción misma de la línea celular.

Los resultados en la prueba de promotores son de gran importancia por estos dos factores: Permiten seleccionar el promotor que mayor cantidad de proteína permitirá producir por unidad de biocatalizador y, además, es el más adecuado para realizar la integración estable de los vectores en el genoma de las células hospedadoras.

En el caso de los péptidos señales, el estudio de los mismos con vistas a la producción de proteínas recombinantes ha sido mucho más limitado, estando más centrado en estudios bioquímicos, biomédicos o moleculares, ya que existen péptidos señales de diferentes tipos, no solo para secreción. No obstante, se han realizado diferentes estudios especialmente en la línea CHO<sup>12,13</sup>, la más ampliamente utilizada en producción de proteínas recombinantes. Los resultados expuestos en este capítulo acerca de la secreción de eGFP por parte de las poblaciones estables de células HEK293 seleccionadas demuestran la importancia de su estudio previo a la construcción de cualquier línea, atendiendo a las diferencias que presenta la eficacia de péptidos señales, como el de la IL-2 o la Albumina, descritos como muy eficaces en otras líneas celulares<sup>18</sup>.

La identificación durante este estudio del péptido señal del IFN $\alpha$ 2 como una señal de gran potencia secretora en HEK293 ha permitido su aplicación directa para la expresión de proteínas de interés terapéutico en las mismas células. Los resultados obtenidos en este experimento han sido diferentes en función de la proteína utilizada, con una leve pérdida de productividad específica en el caso del IFN $\gamma$  y, en cambio, un aumento de entre 3 y 5 veces en el caso del Trastuzumab.

Este hecho demuestra que la demostrada influencia del péptido señal en la productividad podría ser específica para cada proteína, no siendo posible, por el momento, definir una “señal universal” de gran eficacia para todas las proteínas. Las causas últimas (moleculares) de este fenómeno no son conocidas, aunque se puede teorizar que la secreción de IFN $\gamma$  puede estar mucho más optimizada para su propio péptido señal (por cuestiones evolutivas) que, con otra señal, aunque sea de una molécula relativamente próxima como el IFN $\alpha$ 2, fenómeno que no se observa cuando se aplican ambos péptidos a una proteína no secretada (y, por tanto, más neutral de cara a posibles efectos del péptido señal) como la eGFP.

En cuanto a la secreción del anticuerpo trastuzumab, dado que se trata de una molécula sintética y con una secuencia señal propietaria y desconocida, no es posible realizar una comparación directa con el producto comercial. Sin embargo, dado que ha sido usado en numerosos estudios como anticuerpo terapéutico modelo, el estudio de las características de su secreción ha sido abordado.

Hayardi et al. realizaron un trabajo de optimización de los péptidos señal de diversos anticuerpos terapéuticos, incluido el trastuzumab<sup>19</sup>. La mejor combinación ensayada en ese trabajo es la que ha sido comparada con el péptido señal del IFN $\alpha$ 2, con los resultados descritos (3 veces mayor productividad específica). Dada la importancia de los mAbs terapéuticos en el mercado de biofarmacéuticos actual, el hallazgo de un péptido señal de gran eficacia en la secreción de los mismos reviste gran interés para la industria biotecnológica.

En conclusión, se ha estudiado el efecto de diferentes promotores y péptidos señal para la expresión de proteínas recombinantes en HEK293, identificando como mejor combinación la del promotor CMV y el péptido señal del interferón alfa-2. Su aplicación a la secreción de moléculas terapéuticas produce resultados divergentes, con poco o ningún efecto en la secreción de interferón gamma y un aumento de entre 3-5 veces en la producción de trastuzumab.

En el siguiente capítulo del presente trabajo, se estudiará otro elemento determinante en la generación de líneas celulares productoras: El marcador de selección.

#### 4.6 Referencias

1. Mauro, V. P. Codon Optimization in the Production of Recombinant Biotherapeutics: Potential Risks and Considerations. *BioDrugs* **32**, 69-81 (2018).
2. Wang, W. *et al.* Impact of different promoters, promoter mutation, and an enhancer on recombinant protein expression in CHO cells. *Sci. Rep.* **7**, 10416 (2017).
3. Peng, L. *et al.* Enhanced recombinant factor VII expression in Chinese hamster ovary cells by optimizing signal peptides and fed-batch medium. *Bioengineered* **7**, 189-197 (2016).
4. Baumann, M. *et al.* Preselection of recombinant gene integration sites enabling high transcription rates in CHO cells using alternate start codons and recombinase mediated cassette exchange. *Biotechnol. Bioeng.* **114**, 2616-2627 (2017).
5. Jiang, Z., Huang, Y. & Sharfstein, S. T. Regulation of Recombinant Monoclonal Antibody Production in Chinese Hamster Ovary Cells: A Comparative Study of Gene Copy Number, mRNA Level, and Protein Expression. *Biotechnol. Prog.* **22**, 313-318 (2006).
6. Derouazi, M. *et al.* Genetic characterization of CHO production host

- DG44 and derivative recombinant cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **340**, 1069-1077 (2006).
7. Kelly, R. B. Pathways of protein secretion in eukaryotes. *Science* **230**, 25-32 (1985).
  8. Rabouille, C. Pathways of Unconventional Protein Secretion. *Trends Cell Biol.* **27**, 230-240 (2017).
  9. Bonin-Debs, A. L., Boche, I., Gille, H. & Brinkmann, U. Development of secreted proteins as biotherapeutic agents. *Expert Opin. Biol. Ther.* **4**, 551-558 (2004).
  10. Tessier, D. C., Thomas, D. Y., Khouri, H. E., Laliberié, F. & Vernet, T. Enhanced secretion from insect cells of a foreign protein fused to the honeybee melittin signal peptide. *Gene* **98**, 177-183 (1991).
  11. Huang, Y. *et al.* Identification and quantification of signal peptide variants in an IgG1 monoclonal antibody produced in mammalian cell lines. *J. Chromatogr. B* **1068-1069**, 193-200 (2017).
  12. Knappskog, S. *et al.* The level of synthesis and secretion of Gaussia princeps luciferase in transfected CHO cells is heavily dependent on the choice of signal peptide. *J. Biotechnol.* **128**, 705-715 (2007).
  13. Kober, L., Zehe, C. & Bode, J. Optimized signal peptides for the development of high expressing CHO cell lines. *Biotechnol. Bioeng.* **110**, 1164-1173 (2013).
  14. Guo, Z. S., Wang, L. H., Eisensmith, R. C. & Woo, S. L. Evaluation of promoter strength for hepatic gene expression in vivo following adenovirus-mediated gene transfer. *Gene Ther.* **3**, 802-10 (1996).
  15. Morris, T. D. & Miller, L. K. Promoter influence on baculovirus-mediated gene expression in permissive and nonpermissive insect cell lines. *J. Virol.* **66**, 7397-405 (1992).
  16. Brown, A. J., Sweeney, B., Mainwaring, D. O. & James, D. C. Synthetic promoters for CHO cell engineering. *Biotechnol. Bioeng.* **111**, 1638-1647 (2014).
  17. Moritz, B., Becker, P. B. & Göpfert, U. CMV promoter mutants with a reduced propensity to productivity loss in CHO cells. *Sci. Rep.* **5**, 16952 (2015).
  18. Chen, W. *et al.* High-efficiency secretory expression of human neutrophil gelatinase-associated lipocalin from mammalian cell lines with human serum albumin signal peptide. *Protein Expr. Purif.* **118**, 105-112 (2016).
  19. Haryadi, R. *et al.* Optimization of heavy chain and light chain signal peptides for high level expression of therapeutic antibodies in CHO cells. *PLoS One* **10**, e0116878 (2015).

# CAPITULO 5

## 5. RESULTADOS (III): DESARROLLO DE MARCADORES DE SELECCION METABOLICOS PARA LA LINEA HEK293

### 5.1 Introducción

La producción biotecnológica de proteínas bioterapéuticas usando células de mamífero hace uso, en la práctica totalidad de los casos, de líneas celulares modificadas genéticamente, de forma que integren de manera estable en su genoma el gen que codifica para la proteína de interés<sup>1</sup>.

La obtención de estas líneas se realiza mediante el proceso de transfección estable, en contraposición a la transfección transiente o transitoria, ambas ensayadas ya en el presente trabajo (Capítulo 2). Las razones para la elección de esta forma de producción son variadas, pero pueden resumirse principalmente en:

- **Regulatorias:** Las agencias regulatorias exigen procesos altamente reproducibles y esto es mucho más sencillo de garantizar una vez se dispone de una línea celular estable perfectamente caracterizada que en procesos de transfección transitoria, en los cuales el número de factores a controlar para garantizar la reproducibilidad es superior, al ser un proceso más complejo<sup>1</sup>.
- **Productivas:** Aunque es posible obtener producciones muy elevadas de una proteína de interés usando transfección transitoria<sup>2</sup>, las modernas técnicas de construcción de líneas celulares permiten superar ampliamente esos títulos productivos<sup>3</sup>. Además, resulta complicado realizar procesos de transfección transitoria a partir de una determinada escala.
- **Económicas:** La transfección transitoria necesita de cantidades elevadas de DNA, ya que este es el “reactivo inicial” que la célula (Biocatalizador) transformará en la proteína de interés. Debido a

ello, es necesario un proceso paralelo de producción y purificación de DNA adaptado a la escala a la que se esté trabajando<sup>4</sup>. Esto, en una planta de producción, requiere unas instalaciones dedicadas, con el consiguiente aumento de coste<sup>5</sup>. Además, es un proceso que también ha de ser validado y regulado como el proceso principal de producción, incurriendo en costos adicionales en concepto de garantía de calidad.

En el caso de las células HEK293, su alta tasa de transfección<sup>6,7</sup> permite que sean usadas rutinariamente para producir a nivel de laboratorio proteínas de manera transitoria. No obstante, todos los biológicos aprobados por la FDA que son producidos en HEK293 (Tabla 3), se manufacturan usando líneas estables<sup>8-12</sup>.

La obtención de una línea que integre de forma estable un determinado gen en su cromosoma depende de la inclusión en el vector de un elemento que actúe como marcador de selección, es decir, que permita separar o distinguir las células que han integrado el vector de aquellas que no lo han hecho. Estos elementos son, normalmente, genes que codifican proteínas que confieren una ventaja a la célula transfectada, ya sea mediante la resistencia a una sustancia tóxica externa o mediante la posibilidad de metabolizar un nutriente, o bien proteínas marcadoras que permiten al investigador separar las células marcadas de las no marcadas.

De manera general, los marcadores de selección utilizados consisten en genes que codifican para proteínas que confieren resistencia a un antibiótico al cual la línea celular es sensible. Este tipo de marcadores es comúnmente usado en bacterias y levaduras, pero también tradicionalmente en células de mamífero, con ejemplos como la puromicina<sup>13</sup>, la geneticina<sup>14</sup>, la higromicina<sup>15</sup> o la zeocina<sup>16</sup>.

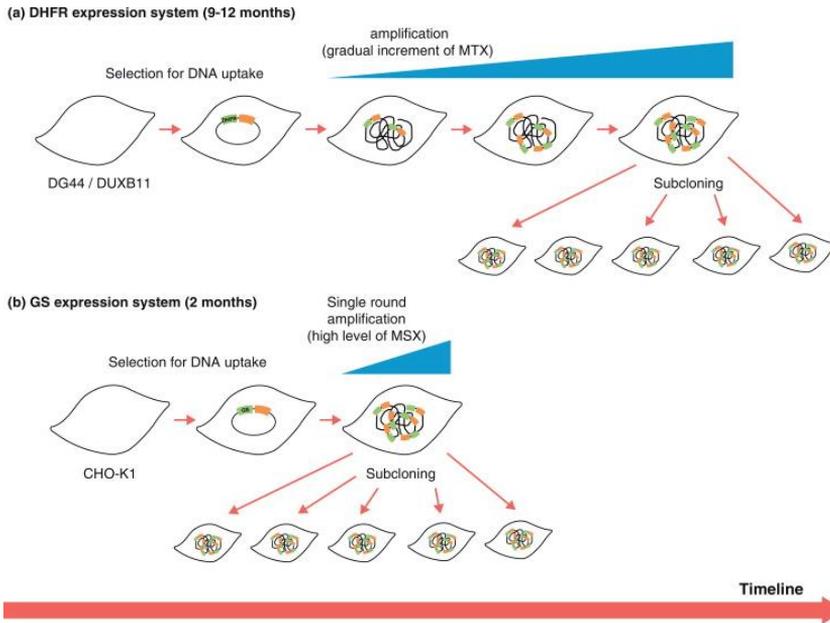
Sin embargo, el uso de antibióticos como agentes selectivos presenta también una serie de desventajas, que van desde la necesidad de mantener en todo momento la presión selectiva, ante el progresivo deterioro del antibiótico (hecho que conlleva cambios en las condiciones selectivas<sup>17</sup>), así como aspectos regulatorios, ya que las agencias regulatorias obligan a demostrar que el producto final está libre de antibióticos<sup>18</sup>, dado que en este caso son, además, tóxicos para las células animales. Por otra parte, los antibióticos usados para seleccionar

células animales son, por norma general, mucho más caras que sus contrapartes bacterianas.

Como alternativa, existen sistemas de selección basados en genes metabólicos, que confieren a la célula la capacidad de sintetizar un compuesto esencial para la célula que no está presente en el medio de cultivo selectivo, produciendo la muerte de aquellas células que no han integrado el gen en su genoma. Estos sistemas tienen la ventaja de no necesitar, per se, la adición de ningún componente al medio, sino la ausencia o deprivación de uno de ellos, mejorando los costes del proceso y manteniendo los mismos niveles de presión selectiva a lo largo del mismo.

Por estas razones los sistemas de selección metabólicos son preferidos industrialmente. Los sistemas de selección más usados son los genes de la Dihidrofolato reductasa (DHFR) y de la Glutamina sintetasa (GS) en células CHO y NS0<sup>19-21</sup>, que carecen de estos genes o los expresan a un nivel muy bajo, permitiendo la selección de clones recombinantes. Además, se han desarrollado inhibidores para ambos marcadores (Metotrexato para la DHFR y metionina sulfoximina, MSX para la GS) que permiten aumentar considerablemente la producción específica de las líneas celulares.

Los inhibidores mencionados (Metotrexato o MSX) son moléculas que inhabilitan a la enzima que actúa como marcador de selección para llevar a cabo su reacción. Mediante la adición de inhibidores a determinados niveles, se consigue que solo aquellas células que expresan en grandes cantidades el marcador de selección consigan sobrevivir a la creciente presión selectiva. Este efecto se consigue por cuestiones epigenéticas o bien por multiplicación aleatoria del número de copias del gen marcador<sup>22,23</sup>, lo que normalmente lleva aparejado el mismo efecto en el gen de interés. Este proceso es más rápido usando el sistema de GS en lugar del DHFR, ya que es posible realizar la selección en un solo paso (Fig. 5.1).



**Figura 5.1. Selección de células transfectadas establemente mediante genes metabólicos y posterior aumento de la productividad específica mediante inhibidores. Extraído de Noh et al 2013<sup>24</sup>**

El uso de estos inhibidores es uno de los factores que han permitido las altas productividades de las células CHO y que las han convertido en la célula de mamífero más ampliamente usada para la producción industrial de proteínas bioterapéuticas, otorgándole gran ventaja sobre otros tipos celulares.

En la célula HEK293 no resulta posible la aplicación de estos sistemas, ya que la presencia de altos niveles endógenos de DHFR y GS impide la selección de los clones recombinantes, incluso aunque se usen grandes concentraciones de inhibidores. Debido a ello no existen, hoy en día, sistemas industriales para la selección metabólica de células HEK293, existiendo una única publicación acerca de la posibilidad de usar la GS mediante la aplicación de tecnologías de edición genómica.

Debido a este hecho, durante el presente capítulo se explorará la posibilidad de desarrollar marcadores metabólicos para la línea celular HEK293, usando dos estrategias:

1. En primer lugar, se realizará un *screening* para evaluar las posibles auxotrofias para azúcares, aminoácidos y nucleótidos que pueda tener la célula HEK293, con el fin de explotarlas como marcadores de selección.
2. Se construirán, mediante tecnologías de edición genómica (CRISPR/Cas9), líneas celulares defectivas en genes clave, como la timidilato sintetasa (TS) o la anteriormente citada GS, y se probarán como huéspedes para la producción de proteínas usando estos genes como marcadores de selección.

## **5.2 Obtención de líneas celulares auxotróficas**

### **5.2.1. Auxotrofias naturales**

#### *5.2.1.1. Búsqueda de auxotrofias*

Para la realización del screening de auxotrofias se cultivó la línea celular HEK293 en placas de 12 pocillos usando 1mL medio de cultivo estándar SFM4Transfex suplementando con 5% de FBS, ya que se había comprobado que, en estas condiciones, las células quedan adheridas a la placa de cultivo, facilitando el lavado de las placas con PBS. Posteriormente, el medio fue recambiado por un medio DMEM al que le faltaba el componente que se deseaba ensayar. La viabilidad de las células fue seguida durante 2 semanas mediante observación al microscopio de contraste de fases.

Se probaron compuestos de dos familias (carbohidratos y aminoácidos o ácidos orgánicos) para comprobar las auxotrofias naturales que pudiera tener la célula HEK293. Los azúcares probados fueron la glucosa, la fructosa y la galactosa, usando un medio DMEM completo en aminoácidos. En el caso de los aminoácidos y ácidos orgánicos, se probaron la glutamina, el glutamato, la tirosina y el ácido alfa-cetoglutarico, usándose medio DMEM con glucosa y todos los demás aminoácidos o ácido orgánico excepto los que se ensayaban.

Los resultados obtenidos en este experimento se detallan en la tabla 1:

**Tabla 1. Resultados del test de auxotrofias de la línea HEK293**

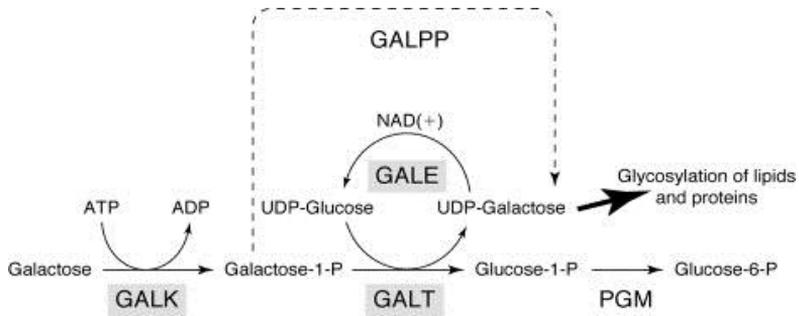
Medio	Fuente Carbono única	Viabilidad (1 semana cultivo)	Observaciones
<b>SFM4+Glutamina</b>	Glucosa	>90%	Control+
<b>DMEM+Glutamina</b>	NA	<5%	Control-
<b>DMEM+Glutamina</b>	Glucosa	>90%	
<b>DMEM+Glutamina</b>	Fructosa	>90%	
<b>DMEM+Glutamina</b>	Galactosa	<5%	
Medio	Aminoácido o ácido orgánico eliminado	Viabilidad (1 semana cultivo)	Observaciones
<b>DMEM+Glucosa</b>	Todos	<5%	Control-
<b>DMEM+Glucosa</b>	Glutamina	>90%	
<b>DMEM+Glucosa</b>	Glutamato	>90%	
<b>DMEM+Glucosa</b>	Tirosina	<5%	
<b>DMEM+Glucosa</b>	$\alpha$ -cetoglutarico	>90%	

Como se observa en los resultados presentados, las células HEK293 son muy versátiles metabólicamente y pueden usar una variedad de fuentes de carbono (Glucosa y Fructosa) y son capaces de sintetizar los aminoácidos probados, incluyendo la glutamina, hecho que está en consonancia con la literatura descrita<sup>25</sup>. No obstante, no son capaces de usar la galactosa como fuente de carbono y, además, son auxótrofas para el aminoácido tirosina. Por lo tanto, son dos vías que se pueden explotar para definir un marcador de selección metabólico.

De entre estas dos auxotrofías se ha decidido aprovechar la del aminoácido tirosina por varias razones:

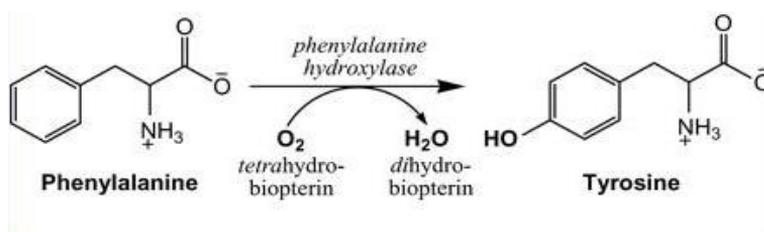
- La ruta que permite la metabolización de la galactosa está compuesta por varias reacciones encadenadas (Fig. 5.2), incluyendo algunas reacciones con regeneración de cofactores. Dado que no es conocida que parte de la ruta está activa en HEK293, si es que existe alguna de las enzimas en cantidad suficiente, sería necesario realizar un estudio y una

modificación genética extensivas para restaurar esta capacidad. Por otra parte, la ruta biosintética necesita de la presencia de glucosa para la formación de uno de los compuestos intermedios (UDP-Glucosa), significando esto la necesidad de incluir glucosa en el medio y haciendo inútil el esfuerzo selectivo.



**Figura 5.2.** Ruta Leloir para el metabolismo de la galactosa. La galactosa es fosforilada por la enzima galactokinasa (GALK), para posteriormente pasar a glucosa-1-fosfato mediante la reacción combinada de la galactosa-1-fosfato uridiltransferasa (GALT) y la galactosa-4-epimerasa (GALE). Esta última reacción necesita de la presencia de UDP-glucosa para ser realizada.

- Contrariamente, se puede usar una sola enzima, la Fenilalanina Hidroxilasa (EC 1.14.16.1) para catalizar la reacción de Fenilalanina a Tirosina y eliminar la auxotrofia (Fig 5.3).



**Figura 5.3.** Reacción de la Fenilalanina con el O<sub>2</sub> para formar tirosina y H<sub>2</sub>O en presencia del cofactor tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), catalizada por la enzima Fenilalanina hidroxilasa

- Además, existen varios inhibidores descritos de esta enzima que se podrían usar para realizar una amplificación de la productividad específica, de manera análoga al sistema DHFR y MTX<sup>26,27</sup>.

Por ello, se evaluará la construcción de un marcador de selección basado en la enzima Fenilalanina hidroxilasa (PAH) en un medio sin tirosina.

#### *5.2.1.2. Complementación de la auxotrofia para la tirosina mediante PAH*

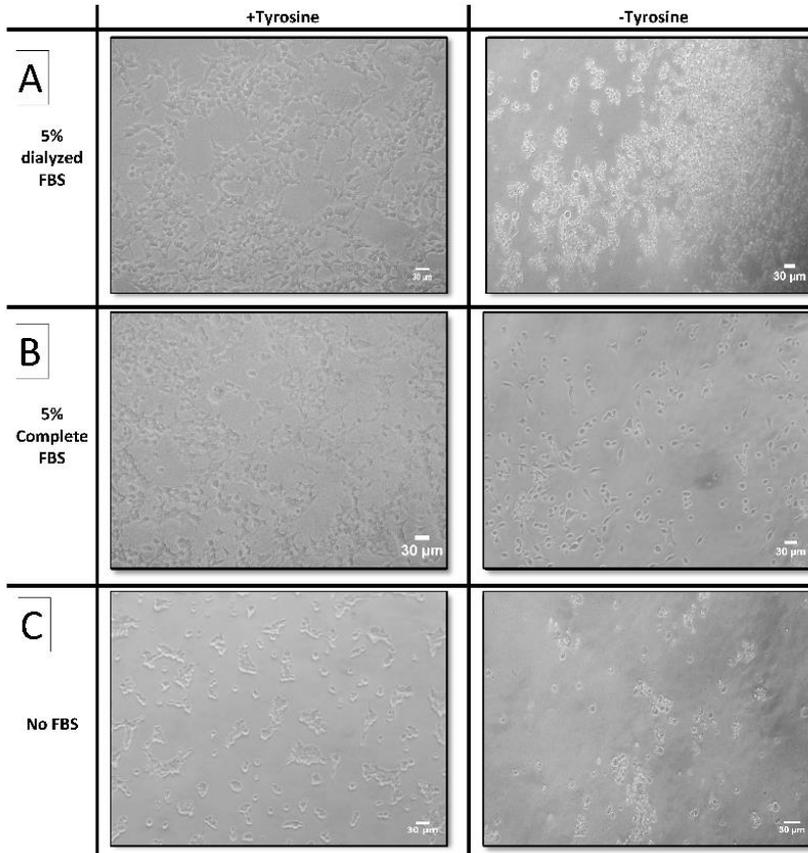
La enzima Fenilalanina hidroxilasa (PAH) ha sido estudiada extensivamente en el pasado por su papel en la fenilcetonuria, una enfermedad consistente en la carencia de esta enzima, que se traduce en la incapacidad para sintetizar la tirosina en cantidades suficientes y en la acumulación de la fenilalanina hasta alcanzar niveles tóxicos en el cuerpo humano.

Se demostró que la transfección de este gen a una célula auxótrofa para la tirosina puede revertir esta auxotrofia, siendo este el único trabajo publicado hasta el momento acerca del uso de esta enzima como marcador de selección para la producción de un retrovirus en células de ratón NIH/3T3<sup>28</sup>. El uso de este marcador para la producción de proteínas recombinantes en células humanas o de otro tipo no ha sido reportado.

Para verificar si la transfección de este gen podía restaurar la auxotrofia para la tirosina en células HEK293, se clonó el ORF completo de la fenilalanina hidroxilasa en el vector pIRESpuro3, resultando el vector pPAH\_IRESpuro3. Este vector se transfectó en HEK293 y se seleccionaron células resistentes a puromicina en medio SMF4T suplementado con un 5% de FBS y 2mg/L de Puromicina, siguiendo el procedimiento habitual, con el fin de asegurar que toda la población expresaba el gen de la PAH.

Una vez seleccionada la población resistente, se realizó un recambio de medio de cultivo completo por medio DMEM sin tirosina, observándose que las células permanecían vivas, pero con morfologías pre-apoptóticas. Dado que el medio DMEM se usa normalmente con un 10% de FBS, es posible que por sí solo sea un medio demasiado pobre para permitir el crecimiento de las células. Sin embargo, existía la preocupación de que el FBS contenga tirosina, razón por la

cual no fue añadido al principio. Por esta razón se decidió realizar un estudio acerca de la posibilidad de usar suero dializado para mejorar el crecimiento de las células HEK293, a la vez que se mantenían las condiciones selectivas. Los resultados de este estudio se pueden observar en la figura 5.4.



**Figura 5.4. Fotografías de microscopía de contraste de fases que muestran el tamaño, la morfología y la adherencia de las células HEK293 no transfectadas en la placa de cultivo cuando se cultivan en DMEM con (Izquierda) o sin tirosina (Derecha) y sin suero © o se suplementan con FBS (B) o con FBS dializado (A).**

En la mencionada figura se observa claramente como la presencia de FBS en el medio permite el crecimiento de las células hasta confluencia, con morfología adherente típica de las células en buen estado. Ello es prueba de que el FBS debe contener una cantidad no determinada de tirosina, ya que las células son igualmente capaces de crecer cuando se ha eliminado este aminoácido,

contrariamente a lo que ocurre cuando no se añade suero. La adición de suero dializado contra buffer PBS no perjudica el crecimiento celular en estas condiciones y permite mantener, en cambio, las condiciones selectivas.

Una vez establecido el medio de cultivo óptimo para la selección basada en PAH, se repitió la misma prueba usando las células transfectadas con pPAH\_IRES<sub>puro</sub>. En este caso las células fueron capaces de crecer en medio DMEM suplementado con un 5% de FBS sin tirosina, demostrando la posibilidad de revertir la auxotrofia en HEK293 y de usar, por tanto, la enzima PAH como marcador de selección en la producción de proteínas recombinantes. En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en este experimento

**Tabla 2. Comparación cualitativa del crecimiento y morfología celular entre células HEK293 transfectadas con PAH y no transfectadas en diferentes formulaciones de medios DMEM. (≈) significa crecimiento lento, con agregación y baja adherencia, (+) es crecimiento normal y (-) significa muerte celular en menos de una semana de cultivo**

Medio	No transfectadas	Transfectadas con pPAH_IRES <sub>puro</sub> 3
DMEM	≈	≈
DMEM+5% FBS	+	+
DMEM -Tyr	-	≈
DMEM -Tyr +5% FBS	+	+
DMEM -Tyr +5% Dial.FBS	-	+

## 5.2.2. Auxotrofias generadas artificialmente mediante CRISPR/Cas9

### 5.2.2.1 Generación de la auxotrofias

Con el fin de aumentar los posibles marcadores de selección a utilizar y poder también aplicar alguno de los sistemas de más implantación industrial anteriormente descritos, se ha usado la edición genómica para obtener líneas celulares de HEK293 deficientes en un determinado gen, que luego pueda ser usado como marcador de selección, complementando la auxotrofia generada mediante modificación genética de la célula huésped.

Se han elegido como candidatos los genes que codifican la timidilato sintetasa (TYMS) y la glutamina sintetasa (GS), que codifican las reacciones de dTMP a partir de dUMP y de glutamina a partir de glutamato y amonio respectivamente y que se muestran en la figura 5.4

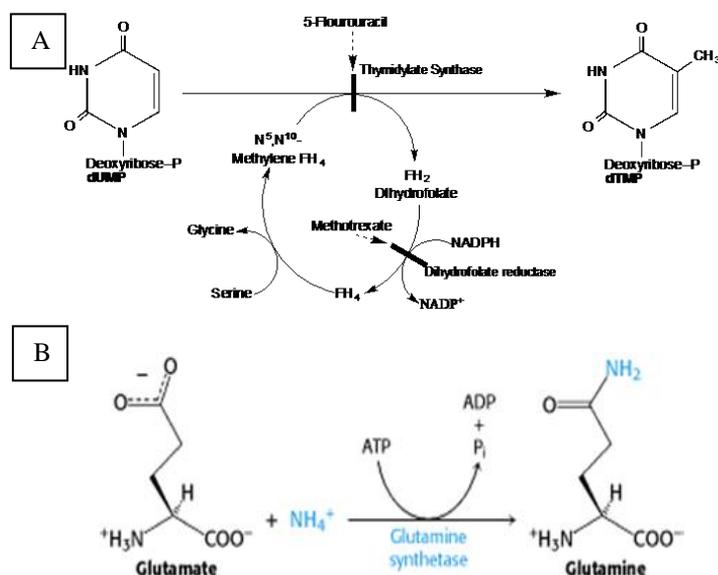


Figura 5.5. Reacciones catalizadas por la timidilato sintetasa (A) y la Glutamina sintetasa (B)

Se han considerado interesantes estas dos rutas por las siguientes razones:

- En el caso de TYMS, es una enzima relacionada con la síntesis de folatos y con la enzima DHFR y se disponen de inhibidores para la misma, con lo que se considera un buen candidato como marcador de selección novedoso, ya que su uso en solitario no ha sido descrito en cultivos celulares de la línea HEK293.
- La GS es el sistema más usado para la selección de líneas industriales de células CHO y su uso en HEK293 solo ha sido explorado muy recientemente y con poca continuidad.

Dado que, como se apuntaba anteriormente, ambos genes están activos en la célula HEK293, se deben construir líneas celulares defectivas para dichos genes

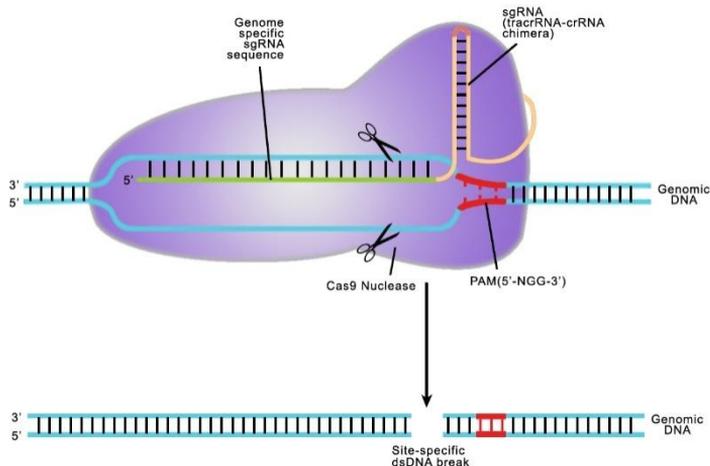
usando herramientas de edición genómica. En el caso que nos ocupa, se ha usado el sistema CRISPR/Cas9.

Los sistemas CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*, repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas) son unas secuencias repetitivas descubiertas inicialmente en 1987 y confirmadas de nuevo en 1993 en el genoma de diversos procariotas<sup>29</sup>, y que están asociadas con la inmunidad de las bacterias<sup>30</sup>. De manera análoga al sistema de protección contra fagos, mediado por las enzimas de restricción, el sistema CRISPR dispone de unos genes asociados Cas (*CRISPR associated genes*) que cortan el DNA de fagos invasores impidiendo la infección. Sin embargo, la principal característica del sistema es la posibilidad de almacenar un “recuerdo” del ataque del fago en forma de información genética contenida en los “espaciadores” del sistema CRISPR. Esto permite a la bacteria construir moléculas de RNA complementarias al DNA del fago invasor (CRISPR RNA o crRNA) ante un nuevo ataque, formando, junto con un RNA activador (tracrRNA), un complejo con una proteína Cas con actividad nucleasa que permite a la bacteria dirigir certeramente el corte de DNA exógeno del fago.

Al igual que ocurriera con las enzimas de restricción en los años 70, el conocimiento del mecanismo de acción del sistema CRISPR/Cas permitió su rápida conversión en herramienta biotecnológica, que se puede encontrar en el trabajo realizado por Doudna, Charpentier y Jinek en los años 2011 y 2012<sup>31,32</sup>. El sistema CRISPR/cas9 simplificado hace uso de la proteína Cas9 de *Staphylococcus aureus* combinado con un RNA quimérico que aúna el tracrRNA y el crRNA naturales y que es conocido como *single guide RNA* (sgRNA) o RNA guía.

En la Fig 5.5 se puede observar el mecanismo de actuación resumido del sistema CRISPR/cas9 utilizado en este trabajo para realizar la edición genómica de las células HEK293. Como se observa, dentro del sgRNA existe una zona que promueve la asociación con la proteína cas9 (*scaffold*) y una secuencia que presenta homología con la secuencia genómica que se pretende editar. Esta zona presenta el requisito de tener adyacente una secuencia PAM (*Promoter adjacent*

*motif*), compuesta de 5'-NGG-3', de gran abundancia en la mayor parte del genoma.



**Figura 5.5. Mecanismo de edición genómica mediante CRISPR/cas9**

El complejo formado por la Cas9 y el sgRNA recorre y verifica o escanea el genoma en busca de PAM's y realiza un corte romo de la doble hebra (*Double strand break*, DSB) allá donde el sgRNA es complementario.

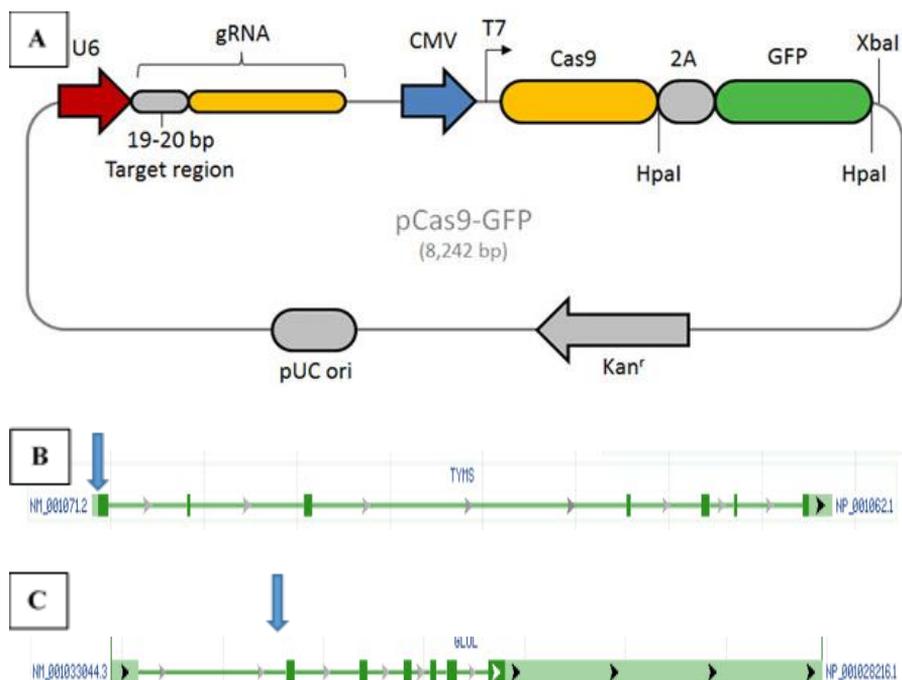
La ruptura de la doble hebra del DNA genómico provoca en la célula una respuesta de reparación denominada recombinación no homóloga (NHEJ, *non-homologous end joining*), consistente en la reparación del daño causado mediante la adición de unas cortas secuencias de DNA llamadas micro-homologas y su posterior ligación para restaurar la integridad estructural del DNA<sup>33</sup>. Este proceso suele causar errores, tanto de adición como de deleción de nucleótidos, por lo que llevado a cabo en la secuencia codificante de un determinado gen puede provocar la pérdida de función del mismo por mutación puntual o cambio en el marco de lectura. Este hecho es el que explotan los sistemas CRISPR y similares para conseguir la supresión de la función de un determinado gen.

Con el sistema CRISPR es posible elegir la zona del genoma a editar simplemente variando los 20 nucleótidos de reconocimiento homólogo en el sgRNA. Este hecho, unido a la alta eficacia en la edición, provoca que el sistema

CRISPR se considere un sistema revolucionario, llamado a substituir los anteriores sistemas de edición, que comenzaron a aparecer por los años 2000, como los ZFN y los TALEN. La simplicidad de CRISPR, que solo necesitar variar una secuencia de nucleótidos para editar diferentes zonas, se contrapone con la mayor complejidad de ZFN y TALEN, ya que en estos casos es necesario el desarrollo y modificación de una nucleasa exprofeso para cada secuencia a editar, proceso mucho más laborioso y costoso<sup>34</sup>.

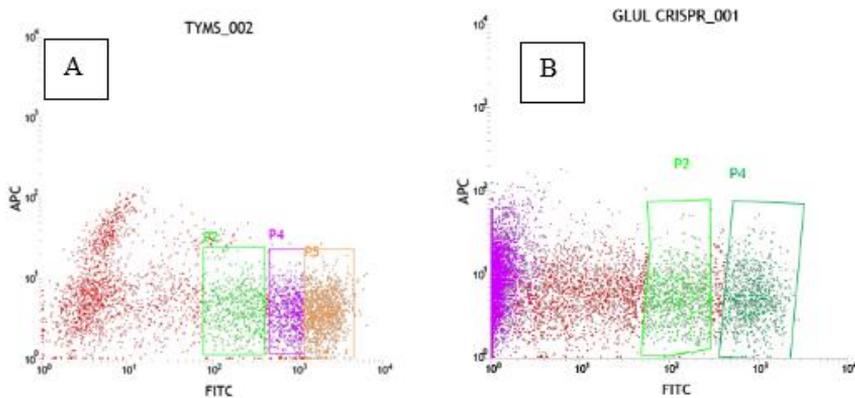
Para llevar a cabo la edición genómica con CRISPR/cas9 con el fin de obtener líneas celulares defectivas en TYMS y GS (TYMS KO y GS KO), se han diseñado sgRNA específicos que tengan como diana la secuencia codificante (ORF) de ambas proteínas, en concreto el primer exón de cada una de ellas. Esta elección se ha realizado para minimizar la posibilidad de que la edición genómica no sea completa y se obtenga una proteína truncada o mutada, pero con cierta funcionalidad. En la figura 5.6 se puede observar el mapa del vector CRISPR que se ha usado en la para estas ediciones genómicas en el presente trabajo y las zonas elegidas dentro de los genes codificantes de cada una de las dos proteínas.

La edición genética se ha realizado mediante la transfección en la línea HEK293 de los vectores que contienen los genes del sgRNA junto con el de la nucleasa Cas9 unida a eGFP, lo cual permite distinguir, gracias a la fluorescencia de esta proteína, que células han sido transfectadas y que nivel de expresión de la nucleasa cas9 presentan. Posteriormente mediante *cell sorting* usando un separador celular o *cell sorter* se han establecido líneas celulares monoclonales en placas de 96 pocillos (Ver Capítulo 9). De estos pocillos, se han seleccionado poblaciones dentro de las células que presentaban diversos grados de fluorescencia, para maximizar la posibilidad de escoger un clon editado sin que presentase efectos adversos (*off-targets*) debido a la alta actividad del CRISPR. En la figura 5.7 se pueden observar los gráficos de citometría correspondientes al aislamiento de esto clones y un resumen del proceso de obtención.



**Figura 5.6.** Mapa del vector usado para realizar las ediciones genómicas. Consta de un promotor U6 para transcribir el sgRNA y de un promotor CMV para la expresión de la nucleasa Cas9. Esta se encuentra unida a una GFP mediante un péptido autoprocesable 2A. (A). Zonas de edición en la secuencia codificante de TYMS (B) y GS (C). Las flechas marcan el exón donde se realiza el reconocimiento del sgRNA. En ambos casos se ha escogido el primer exón.

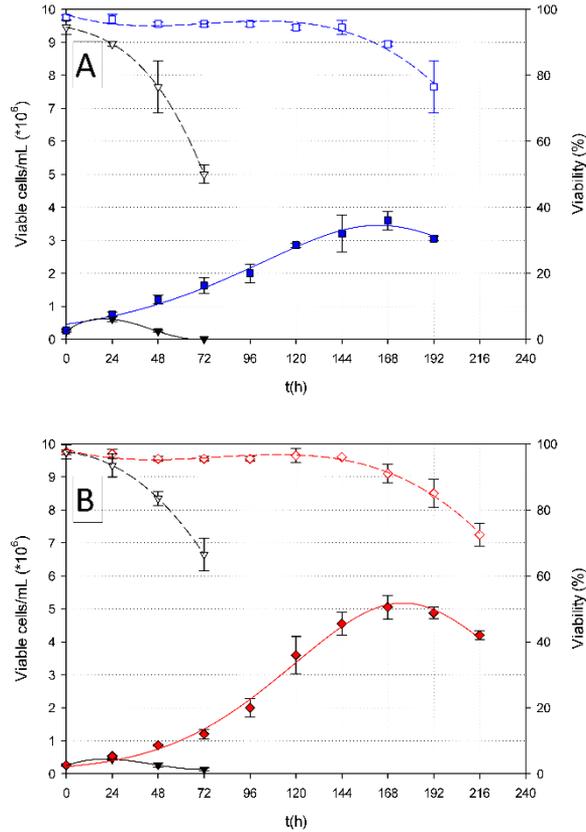
Para el aislamiento de los clones, el medio de cultivo utilizado ha sido suplementado con timidina 16mM (Caso de las células TYMS KO) o Glutamina 4mM (Células GS KO), con el fin de evitar un proceso de selección negativa, en el cual, todas las células editadas morirían precisamente por la edición. Para verificar el éxito de la edición genómica se ha recurrido a la resiembra de los diferentes clones obtenidos en medio de cultivo que no contiene timidina o glutamina, según el caso. Usando esta técnica, se ha conseguido aislar un clon de HEK293 auxótrofo para la timidina (2C10) y otro para la glutamina (4C3), procediéndose a su caracterización cinética tras ser adaptadas con éxito al crecimiento en suspensión en medio de cultivo sin suero. Los resultados de ambas cinéticas se pueden observar en la figura 5.8.



**Figura 5.7. Resultado del *cell sorting* para las células TYMS KO (A) y GS KO (B). Se observa la población dividida en regiones según el nivel de fluorescencia de 530nm (FITC). El clon auxotrofo para la timidina 2C10 fue aislado de la población P2, mientras el clon auxotrofo para la glutamina (2C3) lo fue de la población P4.**

Para obtener esta cinética se han usado los mismos medios suplementados para cada línea celular que se han utilizado durante el aislamiento. Se puede observar que ambas líneas celulares presentan una cinética típica del cultivo de células animales en los medios suplementados, pero no son capaces de crecer en los medios carentes del metabolito para el cual cada una de ellas es auxotrófica, debido al éxito de la edición genética.

Por lo tanto, se ha conseguido realizar la edición genómica de la línea celular HEK293 y de aislar clones auxotróficos para timidina y glutamina, los cuales son susceptibles de ser usados como huéspedes para la producción de proteínas recombinantes usando marcadores de selección alternativos basados en genes metabólicos.



**Figura 5.8. Cinéticas de crecimiento y viabilidad de las líneas celulares auxotróficas para la timidina (A) y la glutamina (B)**

#### 5.2.2.2 Complementación de las auxotrofías

Al igual que se ha descrito anteriormente para la PAH, se realizaron construcciones genéticas análogas para la TYMS y la GS y se transfectaron cada una de ellas a los respectivos clones auxotróficos generados, con el fin de demostrar la posibilidad de utilizar estas enzimas como marcadores de selección en estas líneas celulares.

En el caso de la línea 2C10 auxótrofa para la timidina, se comprobó que la eficacia de transfección de la línea celular había decrecido y era mucho más baja que la considerada como normal para la línea parental HEK293 (15% respecto >70% en condiciones normales). En la línea 4C3 auxótrofa para glutamina no se observó este fenómeno. En ambas líneas se consiguió la reversión total de la

auxotrofia, consiguiendo seleccionar poblaciones transfectadas tras 7 días de cultivo para el marcador TYMS y entre 5-6 días para el marcador GS en condiciones selectivas.

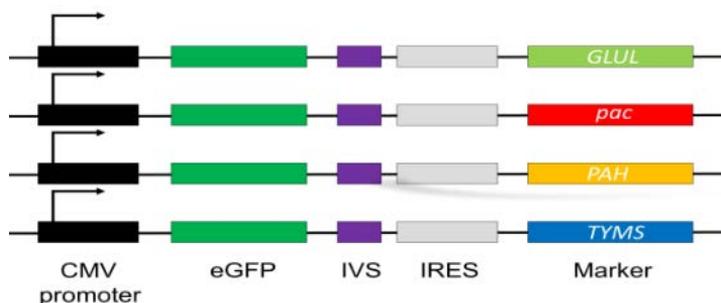
El medio selectivo para cada una de las líneas quedo definido como SFM4T suplementado con un 5% de CB5 y 4mM de Glutamax en el caso de la línea 2C10, dado que ni medio ni suplementos contienen timidina y SFM4T suplementado con un 5% de CB5 y un 6% de GSEM en el caso de la línea 4C3. En este último caso, ni el medio ni los suplementos contienen glutamina, pero se decidió incluir el suplemento comercial GSEM (*Glutamine Synthetase Expression Medium*) ya que se observó un crecimiento deficiente sin él, debido, probablemente, a la poca cantidad de glutamato que lleva el medio base, lo que conllevaría el agotamiento del mismo dado que es el sustrato que se utiliza para generar el aminoácido glutamina gracias a la expresión de la GS. El suplemento GSEM lleva grandes cantidades de glutamato y otros aminoácidos importantes para el correcto funcionamiento del sistema GS.

### **5.3 Eficiencia selectiva y productividad de los diferentes marcadores de selección**

#### **5.3.1. Eficiencia de los marcadores de selección**

El primer requisito que ha de cumplir un marcador de selección es el de permitir la construcción de una población de células 100% transfectadas, garantizando la expresión del gen de interés y eliminando aquellas células que no integran la construcción genética de interés en su genoma.

Para probar la eficiencia de cada uno de los marcadores desarrollados, se han construido vectores bicistronicos que combinan la expresión de la proteína reporter eGFP con la del marcador de selección correspondiente (fig 5.9). Esto ha permitido calcular la eficiencia de transfección y, tras realizar el procedimiento de cultivo en condiciones selectivas, verificar que el 100% de las células obtenidas son fluorescentes. Como control se ha usado la puromicin-acetil-transferasa (pac), marcador de resistencia tradicional a antibióticos.

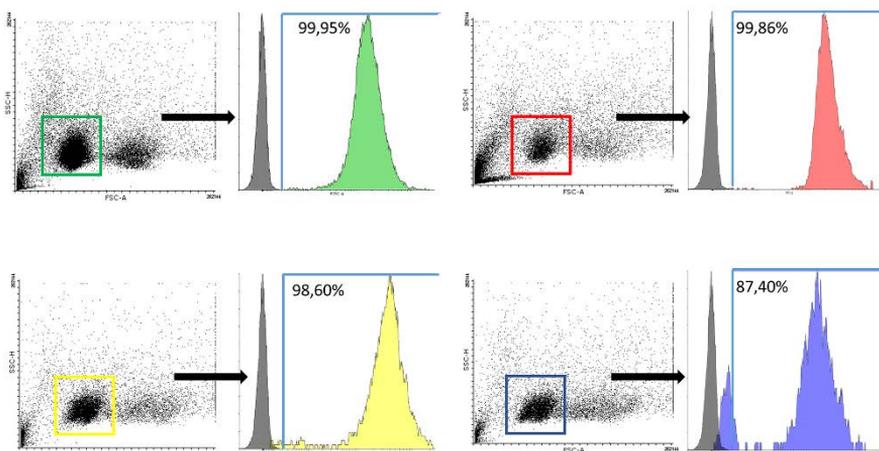


**Figura 5.9. Constructos utilizados para la evaluación de la eficiencia y de la productividad específica.**

Para realizar el test, se han transfectado los vectores a las líneas celulares correspondientes y se ha procedido a la selección de las poblaciones modificadas genéticamente usando en cada caso las condiciones selectivas para cada marcador definidas en el apartado anterior. Tras la muerte de los controles no transfectados, se ha procedido a la caracterización de las poblaciones obtenidas mediante citometría de flujo

En la figura 5.10 se pueden observar las citometrías efectuadas a cada población obtenida, en las que se compara la fluorescencia de le eGFP con la de un control de células HEK293 no transfectadas. Se ha definido como célula positiva toda aquella que presenta una fluorescencia superior a la del control.

Como se puede observar en el gráfico, los sistemas clásicos como la puromicina y la GS presentan eficiencias similares, con 99,95% y 99,86% de células eGFP+ (positivas). Asimismo, el sistema basado en la selección mediante PAH presenta una eficacia



**Figura 5.10. Análisis mediante citometría de flujo de las diferentes poblaciones seleccionadas con los marcadores de selección GS (Verde), puomicina (Rojo), PAH (Amarillo) y TS (Azul) comparadas con células no transfectadas. Se considera negativa cualquier célula que tenga una fluorescencia inferior a la máxima del control (Línea azul).**

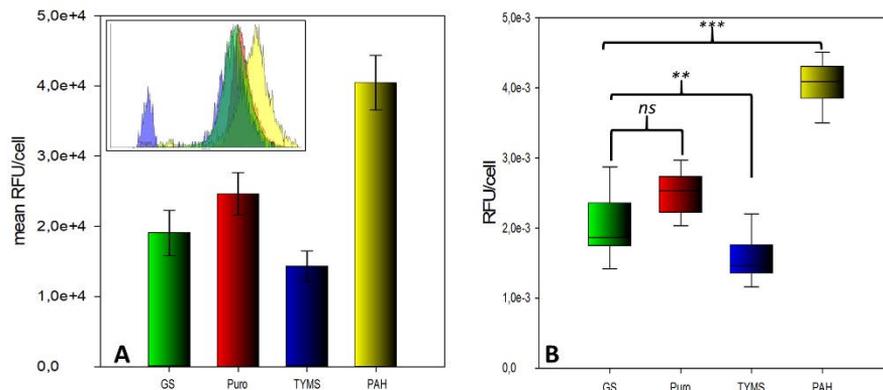
del mismo orden, con 98,6% de células eGFP+. Esto demuestra la posibilidad de usar con éxito estos sistemas como marcadores de selección en líneas celulares HEK293, ya sean salvajes (PAH) o creadas mediante edición genómica (GS). Contrariamente, la eficiencia selectiva del sistema basado en TYMS es muy inferior (87,40%). Observando los resultados de la citometría de flujo se puede llegar a la conclusión de que existe una segunda población, de muy baja o nula fluorescencia, que provoca esta baja eficiencia y que estaría consiguiendo sobrevivir sin la expresión de TYMS, lo que limita seriamente la utilidad de este sistema como marcador de selección.

### **5.3.2. Productividad específica de cada sistema**

Usando la citometría de flujo realizada, se ha realizado el cálculo de fluorescencia media por cada célula para determinar el efecto de cada uno de los marcadores de selección en la producción específica de las poblaciones seleccionadas.

Asimismo, se ha realizado un análisis mediante espectrofluorimetría a partir de cultivos realizados a partir de cada una de las poblaciones generadas y el resultado obtenido ha sido relacionado (dividido) con el número de células, con el

objetivo de calcular también la producción específica y compararlo con la citometría de flujo. Los resultados de estos experimentos se pueden observar en la figura 5.11.



**Figura 5.11. Producción específica de cada uno de los sistemas selectivos calculada mediante citometría de flujo (A) o espectrofluorimetría (B)**

Del análisis de los resultados se puede extraer que la producción específica de cada célula usando el sistema PAH ( $4 \cdot 10^4$  rfu/cell) aproximadamente duplica el de aquellas que usan los sistemas clásicos de GS ( $1,9 \cdot 10^4$  rfu/cell) o puromicina ( $2,4 \cdot 10^4$  rfu/cell). Por el contrario, la producción específica usando el sistema TYMS es la menor de las exploradas, con solo  $1,4 \cdot 10^4$  cell/mL.

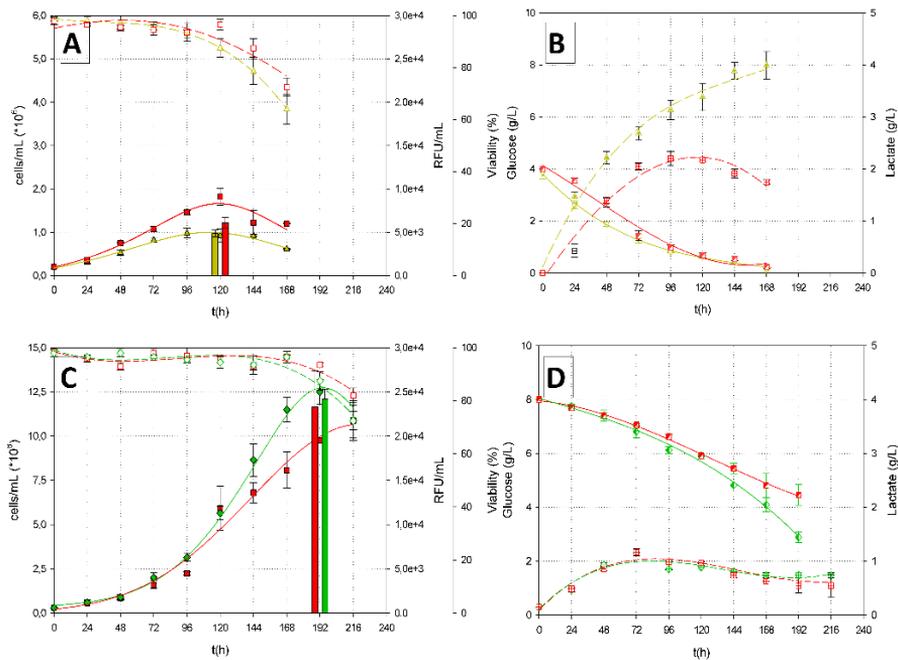
La explicación para esta baja productividad puede deberse a la presencia de células poco o nada fluorescentes, como se ha descrito en el apartado anterior. La razón de la presencia de estas células puede ser debida a la posibilidad de que células no transfectadas sobrevivan al proceso de selección debido a la timidina producida por las células transfectadas, si esta luego es secretada al medio y utilizada por la fracción de cultivo no transfectada, lo que les permite sobrevivir. La secreción de timidina es un hecho demostrado en diversas líneas celulares<sup>35,36</sup>. Para comprobar esta hipótesis se realizó un cultivo de células 2C10 no transfectadas usando un medio acondicionado en el que habían crecido células 2C10 transfectadas con el vector peGFP\_IRESstyms. Al contrario de lo que ocurría cuando eran cultivadas en medio sin timidina exógena, en este caso las células no transfectadas eran capaces de sobrevivir durante unos días en este

medio acondicionado, lo que demostraría la presencia de timidina en el mismo, siendo esta, a su vez, producida y secretada por las células transfectadas. Debido a este comportamiento, el marcador de selección TYMS fue descartado en este punto como marcador de selección viable para el trabajo y no se han realizado ulteriores experimentos con él.

### **5.3.3. Caracterización comparativa del crecimiento y de la producción volumétrica**

Para estudiar el efecto en los parámetros de crecimiento y en la producción de proteínas recombinantes ( en concreto la eGFP) que pudieran tener cada uno de los marcadores de selección metabólicos, se realizó una adaptación al cultivo en suspensión de las poblaciones celulares seleccionadas, usando los medios de cultivo selectivos previamente definidos. Tanto el sistema PAH como el GS fueron comparados de manera individual con el sistema clásico de puromicina, ya que al ser diferentes los medios selectivos no es posible una comparación directa del crecimiento y la producción volumétrica.

Como se observa en la figura 5.12A., las células seleccionadas usando PAH llegan a una densidad celular máxima (MCD) de  $0,98 \pm 0,11 \cdot 10^6$  cells/mL, lo que representa aproximadamente el 50% de la MCD del control seleccionado con puromicina y crecido en las mismas condiciones ( $1,82 \pm 0,20 \cdot 10^6$  cells/mL). Esta diferencia tiene un impacto significativo en la producción volumétrica de eGFP ( $4,9 \pm 0,39 \cdot 10^3$  y  $6,1 \pm 0,57 \cdot 10^3$  RFU/mL para las células seleccionadas con PAH y con puromicina, respectivamente). A pesar de la mayor producción específica del sistema PAH, esta ventaja se ve anulada por el hecho de haber llegado a una densidad celular muy inferior respecto al resto de marcadores. Además, el comportamiento metabólico de las células es completamente diferente (Fig 5.12B), ya que las células seleccionadas con PAH han producido el doble de ácido láctico que las células seleccionadas con puromicina, a pesar de haber consumido unas cantidades parecidas de glucosa.

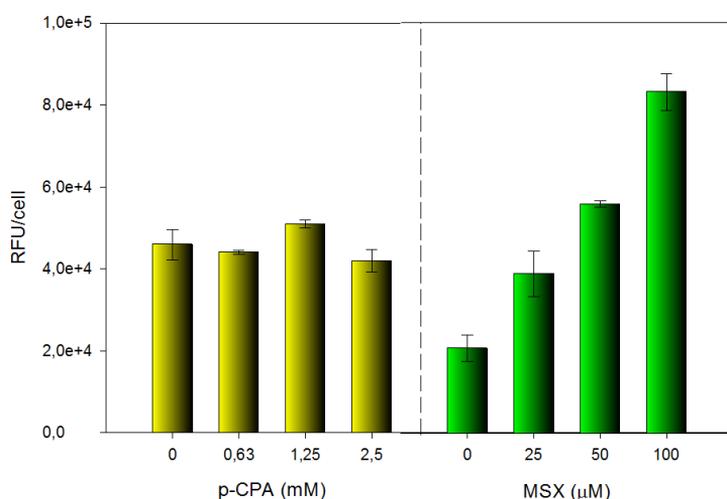


**Figura 5.12.** Perfiles de crecimiento (A) y concentración de metabolitos (B) de células HEK293 productoras de eGFP, seleccionadas usando PAH (▲ Concentración celular, △ Viabilidad celular, ▽ Concentración de glucosa, △ Concentración de ácido láctico) o Puromicina (■ Concentración celular, □ Viabilidad celular, ▣ Concentración de ácido láctico, ▤ Concentración de glucosa). Los cultivos se cultivaron en medio selectivo sin tirosina DMEM+10% DFBS. Perfiles de crecimiento (C) y concentración de metabolitos (D) de células seleccionadas mediante GS (◆ Concentración celular, ◇ Viabilidad celular, ◆ Concentración de ácido láctico, □ Concentración de glucosa) o puromicina cultivadas en medio selectivo SFM4Transfx+10% CB5+GSEM. Las barras en la gráfica A y C representan la expresión de eGFP (RFU / mL) para cada línea celular estudiada. Los símbolos y las barras de error representan el valor medio más la desviación estándar de tres experimentos independientes (N = 3).

En lo que respecta a la selección con GS, la MCD, producción volumétrica y el comportamiento metabólico son parecidos a los del control, permitiendo, por tanto, la aplicación directa de este marcador de selección para la producción de proteínas recombinantes, como se demostrará en los apartados subsiguientes. Debido al uso de medio SFM4T para este experimento, mucho más complejo y rico que el medio DMEM, el control con puromicina muestra un crecimiento 10 veces superior y una producción de eGFP 5 veces superior que las mismas células cultivadas en medio DMEM.

### 5.3.4 Aumento de la producción específica mediante la utilización de inhibidores

Como se señala en el apartado de introducción, una de las principales ventajas de los sistemas de selección metabólicos radica en la posibilidad de aumentar la producción específica de la célula huésped usando inhibidores como la metionina-sulfoximina (MSX), en el caso de la Glutamina sintetasa o de la p-clorofenilalanina (p-CPA), en el caso de la PAH. Para verificar el efecto de la adición de inhibidores en las células HEK293 productoras de eGFP, se sometieron las poblaciones celulares seleccionadas con PAH o GS a concentraciones crecientes de p-CPA o MSX, respectivamente, (en rangos determinados de acuerdo a la literatura consultada) y se realizaron determinaciones de productividad específica mediante citometría de flujo. El resultado se puede observar en la figura 5.13.



**Figura 5.13. Efecto de los inhibidores en la productividad específica de las células HEK293 seleccionadas con PAH (A) o GS (B), y las barras de error representan el valor medio más la desviación estándar de tres experimentos independientes (N = 3)**

Como se puede observar, existe un evidente aumento de la producción específica de las células como resultado de la adición del inhibidor MSX, consiguiendo aumentar unas 6 veces la producción específica de la población celular en comparación con la población control sin MSX. Este aumento de la producción

provoca que el sistema GS alcance la mayor productividad específica respecto a todos los sistemas ensayados.

En cambio, no se observa efecto alguno tras la adición del inhibidor p-CPA sobre las células seleccionadas mediante el sistema PAH.

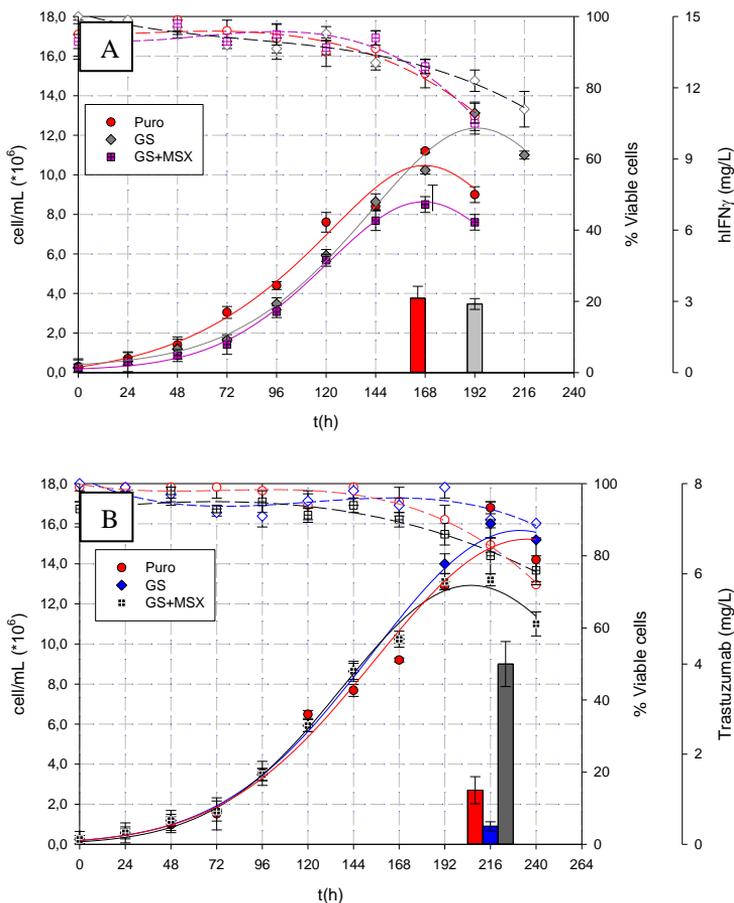
## **5.4 Producción de IFN $\gamma$ y Trastuzumab utilizando como marcador de selección la glutamina sintetasa (GS)**

### **5.4.1. Construcción de líneas productoras usando GS y aumento de la expresión mediante MSX**

Con el fin de demostrar la utilidad del marcador de selección GS en la producción de moléculas de interés terapéutico en HEK293, se realizó la construcción de vectores bicistrónicos que expresaran simultáneamente las proteínas bioterapéuticas y el marcador de selección glutamina sintetasa. Para ello, se escindió el marcador de selección puromicina en los vectores ya construidos y se sustituyó por el gen GLUL que codifica la GS (Ver Capítulo 9).

Los vectores se transfectaron en células HEK293 4C3 y las poblaciones celulares obtenidas tras el periodo de selección fueron caracterizadas cinética y productivamente en comparación con las células HEK293 productoras seleccionadas con puromicina en el capítulo. Los resultados obtenidos se pueden observar en las curvas de crecimiento mostradas en la figura 5.14.

Como se observa, las células presentan un tiempo de duplicación similar, en el rango de 23,5h para las células seleccionadas con GS y de 26h para las seleccionadas con puromicina, en el caso del IFN $\gamma$ . En el caso de las células productoras de Trastuzumab, las diferencias en cuanto a velocidad de crecimiento fueron superiores (En torno a las 28h para las células seleccionadas con puromicina y 32h para las seleccionadas mediante GS). Este hecho ya observado anteriormente en las líneas seleccionadas usando puromicina (Capítulo 3).



**Figura 5.14. Curvas de crecimiento (● Puromicina, ◆ GS, □ GS +MSX) viabilidad (○ Puromicina, ◇ GS, ▣ GS +MSX) y concentración de producto (Barras) para las diferentes líneas celulares productoras de IFN $\gamma$  (A) y Trastuzumab (B)**

Los datos productivos y cinéticos de ambos experimentos se encuentran en la tabla 3. Aunque el nivel de producción volumétrica y de productividad específica es ligeramente inferior en el caso de las células seleccionadas con GS, el uso del inhibidor MSX permite un aumento de la producción específica de las proteínas recombinantes se ha demostrado la posibilidad de utilizar este sistema para la producción de proteínas recombinantes terapéuticas en HEK293, tanto en el caso del IFN $\gamma$  como del trastuzumab. En general, la aplicación del inhibidor MSX ha

permitido un aumento de 2,8 (IFN $\gamma$ ) y 3,5 (Trastuzumab) veces de la productividad específica sobre las células seleccionadas usando puromicina.

**Tabla 3. Datos cinéticos y de producción de proteína de las células seleccionadas con los diferentes sistemas**

Condición	tD (h)	MCD (cell/mL*10 <sup>6</sup> )	Productividad específica (pcd)	Producción volumétrica (mg/L)
<b>IFN<math>\gamma</math> Puro</b>	23,5	11,2 $\pm$ 0,1	0,076	3,13 $\pm$ 0,50
<b>IFN<math>\gamma</math> GS</b>	26,5	13,1 $\pm$ 0,5	0,057	2,89 $\pm$ 0,23
<b>IFN<math>\gamma</math> GS+MSX</b>	26	8,5 $\pm$ 0,4	0,21	6,80 $\pm$ 1,10
<b>Trastuz. Puro</b>	28	16,8 $\pm$ 0,3	0,018	1,20 $\pm$ 0,30
<b>Trastuz. GS</b>	31	16,0 $\pm$ 0,2	0,006	0,40 $\pm$ 0,10
<b>Trastuz. GS+MSX</b>	32	13,2 $\pm$ 0,3	0,064	4,00 $\pm$ 0,50

## 5.5 Conclusiones

El uso de marcadores de selección eficientes es una característica importante a tener en cuenta durante la construcción de líneas celulares productoras de proteínas bioterapéuticas<sup>11</sup>. La expresión estable es preferida sobre la transitoria en este campo, debido a cuestiones económicas y regulatorias<sup>37</sup>.

Aunque el uso de marcadores de elección mediante antibióticos está bien estudiado y es eficiente, resulta ventajoso a nivel industrial, su sustitución por marcadores de selección metabólicos que permitan una mejor economía del proceso y un aumento de la productividad específica de la cepa<sup>38</sup>. No obstante, no existen marcadores de selección metabólicos para la línea celular HEK293 en la que se está realizando este trabajo de tesis.

Durante el presente capítulo, se ha realizado una exploración en profundidad de diversas estrategias para la definición, el desarrollo y la aplicación de marcadores de selección que usen genes metabólicos en esta línea celular mediante diferentes estrategias.

En primer lugar, se ha definido un marcador de selección metabólico que utiliza el gen de la Fenilalanina hidroxilasa (PAH) para seleccionar células en un medio

de cultivo carente de tirosina. Corroborada la auxotrofia natural de las células HEK293 para este aminoácido, se ha definido un medio de cultivo selectivo que permite la producción de proteínas recombinantes en HEK293 usando la PAH como marcador de selección para obtener una población productora estable.

Asimismo, mediante el uso de técnicas de edición genómica, se han desarrollado líneas celulares auxotróficas para la timidina y la glutamina, sobre las que se han ensayado la Timidilato sintetasa (TYMS) y la Glutamina sintetasa (GS) como marcadores de selección.

En términos de evaluación de productividad específica de los diferentes marcadores de selección estudiados, mediante el estudio de la producción específica de eGFP (RFU/célula) de células HEK293 seleccionadas se ha visto que el sistema PAH es un 50% más alto que el obtenido con la selección con puomicina. Esto demuestra que el sistema PAH es un sistema selectivo fuerte (es decir, más astringente) para las células HEK293, con la ventaja respecto a la puomicina de evitar el uso de cualquier tipo de antibiótico.

Sin embargo, surgen algunos aspectos limitantes al analizar los efectos del marcador de selección en la fisiología celular. Se han observado tasas de crecimiento más bajas de las células seleccionadas usando PAH, así como una desregulación del metabolismo central del carbono, con un aumento importante nivel de lactato producido. En consecuencia, el metabolismo alterado condujo a menores densidades celulares y, por lo tanto, a unos títulos de producto reducidos, eliminando la ventaja motivada por una mayor producción específica.

La composición de los medios de crecimiento juega, por lo tanto, un papel importante en el éxito de la actividad metabólica proceso selectivo, especialmente con respecto a las densidades celulares y producciones volumétricas alcanzadas, y es necesario tener en cuenta estos aspectos a la hora de definir cualquier tipo de mejora que permita aumentar la productividad específica de la línea celular, ya que, como en este caso, su efecto puede ser inferior al esperado cuando se pase a una fase productiva.

Debido a su amplio uso industrial, el sistema GS presenta un conjunto completo de medios comerciales optimizados y suplementos de cultivo celular que permiten que este sistema haya funcionado tan bien como la selección de puromicina, con un aumento de diez veces en MCD y 5 veces más producto que el sistema PAH, para el cual se ha usado el medio DMEM clásico. Debido a eso, es necesario un esfuerzo de diseño de medios, después de un profundo estudio metabólico, para obtener el rendimiento máximo del sistema PAH como marcador de selección

Como ya se ha debatido ampliamente, una de las razones principales por las que las células HEK293, a diferencia de las células CHO, carecen actualmente de un adecuado sistema de selección metabólica son sus altos niveles endógenos de GS o DHFR. Los modernos métodos de edición genómica, como CRISPR / Cas9, han permitido desarrollar líneas celulares deficientes para GS y TYMS de una manera rápida y directa. La flexibilidad de estos sistemas permite la generación de otras auxotrofías a voluntad, aunque las características químicas y de transporte de la membrana de cada ruta metabólica deben evaluarse cuidadosamente para evitar efectos secundarios indeseables en la astringencia de selección, como el ocurrido en el presente trabajo al usar el sistema TYMS.

Se ha de señalar que la aplicación de un marcador de selección metabólico, aunque resulta ventajosa desde un punto de vista industrial, por las razones ya comentadas anteriormente, no es, en sí mismo, un medio para el aumento de la productividad específica de la línea celular. El concepto que liga la productividad específica con el marcador de selección es la astringencia de la selección, que equivale a la capacidad de un sistema selectivo para seleccionar y desarrollar, en las adecuadas condiciones selectivas, solo aquellas células que sean más productoras, y no meramente las que sean capaces de resistir la presión selectiva.

Debido a ello, cobra sentido el análisis de las capacidades de los sistemas metabólicos de selección, en comparación con los tradicionales marcadores de resistencia a antibióticos. El uso de inhibidores es la técnica de elección a la hora de aumentar la astringencia y conseguir células más productivas. Como se ha demostrado en el presente trabajo, el uso del sistema GS en la línea HEK293 4C3

combinado con un aumento de la presión selectiva consigue superar la producción específica y volumétrica del sistema tradicional de producción mediante puromicina.

Como conclusión del capítulo, se puede afirmar que un nuevo marcador metabólico para la línea celular HEK293 basado en el gen PAH ha sido probado por primera vez con fines de producción de proteínas recombinantes. El sistema PAH demostró ser un marcador de selección eficiente (98,60% de las células que expresan positivamente) y también para producir un recombinante específico producción de proteínas más alta que los sistemas comerciales bien establecidos basados en selección de antibióticos (puromicina) o auxotrofia (glutamina sintetasa), pero con limitaciones debido al medio de cultivo empleado. Se han usado técnicas de edición genómica para poder aplicar en HEK293, y se ha generado una línea mutante que permite usar GS como marcador de selección metabólica. Se ha estudiado la máxima capacidad de producción de este marcador con respecto al marcador de selección antibiótico y se ha comprobado una superior productividad específica tanto de Trastuzumab como de IFN $\gamma$ .

En el siguiente capítulo del trabajo de tesis, se desarrollarán técnicas para poder integrar las construcciones genéticas codificantes para las moléculas de interés en una localización concreta del genoma, con el fin de obtener un contexto genómico óptimo para la expresión.

## 5.6 Referencias

1. Mignon, C., Sodoyer, R. & Werle, B. Antibiotic-free selection in biotherapeutics: now and forever. *Pathogens* **4**, 157–181 (2015).
2. Daramola, O. *et al.* A high-yielding CHO transient system: Coexpression of genes encoding EBNA-1 and GS enhances transient protein expression. *Biotechnol. Prog.* **30**, 132–141 (2014).
3. Poulain, A. *et al.* Rapid protein production from stable CHO cell pools using plasmid vector and the cumate gene-switch. *J. Biotechnol.* **255**, 16–27 (2017).
4. Rozkov, A., Larsson, B., Gillström, S., Björnstedt, R. & Schmidt, S. R. Large-scale production of endotoxin-free plasmids for transient expression in mammalian cell culture. *Biotechnol. Bioeng.* **99**, 557–566 (2008).

5. Schleef, M. in *Biotechnology Set* 443–469 (Wiley-VCH Verlag GmbH). doi:10.1002/9783527620999.ch20d
6. Cervera, L. & Kamen, A. A. in 117–127 (Humana Press, New York, NY, 2018). doi:10.1007/978-1-4939-7312-5\_10
7. Cervera, L. *et al.* Selection and optimization of transfection enhancer additives for increased virus-like particle production in HEK293 suspension cell cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 9935–9949 (2015).
8. Lalonde, M.-E. & Durocher, Y. Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. *J. Biotechnol.* **251**, 128–140 (2017).
9. Dumont, J., Eewart, D., Mei, B., Estes, S. & Kshirsagar, R. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Crit. Rev. Biotechnol.* **36**, 1110–1122 (2016).
10. Dumont, J. A. *et al.* Prolonged activity of a recombinant factor VIII-Fc fusion protein in hemophilia A mice and dogs. *Blood* **119**, 3024–3030 (2012).
11. Durocher, Y. & Butler, M. Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Curr. Opin. Biotechnol.* **20**, 700–707 (2009).
12. Dietmair, S. *et al.* A Multi-Omics Analysis of Recombinant Protein Production in Hek293 Cells. *PLoS One* **7**, e43394 (2012).
13. Okita, K., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* **448**, 313–317 (2007).
14. Sakurai, A., Doçi, C. L. & Gutkind, J. S. in 163–170 (Humana Press, New York, NY, 2017). doi:10.1007/978-1-4939-6448-2\_11
15. Gurtu, V., Yan, G. & Zhang, G. IRES Bicistronic Expression Vectors for Efficient Creation of Stable Mammalian Cell Lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **229**, 295–298 (1996).
16. Bennett, R. P., Cox, C. A. & Hoeffler, J. P. Fusion of green fluorescent protein with the Zeocin-resistance marker allows visual screening and drug selection of transfected eukaryotic cells. *Biotechniques* **24**, 478–482 (1998).
17. Gellissen, G. *Production of recombinant proteins : novel microbial and eukaryotic expression systems.* (Wiley-VCH, 2005).
18. Organization, W. H. & others. Guidelines on the quality, safety, and efficacy of biotherapeutic protein products prepared by recombinant DNA technology WHO. *Replace. Annex* **3**, (2013).
19. Bebbington, C. R. *et al.* High-level expression of a recombinant antibody from myeloma cells using a glutamine synthetase gene as an amplifiable selectable marker. *Nat. Biotechnol.* **10**, 169–175 (1992).

20. Cacciatore, J. J., Chasin, L. A. & Leonard, E. F. Gene amplification and vector engineering to achieve rapid and high-level therapeutic protein production using the Dhfr-based CHO cell selection system. *Biotechnol. Adv.* **28**, 673–681 (2010).
21. Brown, M. E., Renner, G., Field, R. P. & Hassell, T. Process development for the production of recombinant antibodies using the glutamine synthetase (GS) system. *Cytotechnology* **9**, 231–236 (1992).
22. Achtien, K., Borgschulte, T., Lin, N., George, H. & Kayser, K. J. Selection Process Development in a GS Knock-Out CHO Host Cell Line: The Effects of MSX Addition on Clones Generated in an MSX-Free Process.
23. Noh, S. M., Shin, S. & Lee, G. M. Comprehensive characterization of glutamine synthetase-mediated selection for the establishment of recombinant CHO cells producing monoclonal antibodies. *Sci. Rep.* **8**, 5361 (2018).
24. Noh, S. M., Sathyamurthy, M. & Lee, G. M. Development of recombinant Chinese hamster ovary cell lines for therapeutic protein production. *Curr. Opin. Chem. Eng.* **2**, 391–397 (2013).
25. Yu, D. Y., Noh, S. M. & Lee, G. M. Limitations to the development of recombinant human embryonic kidney 293E cells using glutamine synthetase-mediated gene amplification: Methionine sulfoximine resistance. *J. Biotechnol.* **231**, 136–140 (2016).
26. Koizumi, S. *et al.* Inhibition of phenylalanine hydroxylase, a pterin-requiring monooxygenase, by ouidenone and its derivatives. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **35**, 458–462 (1982).
27. Žanic-Grubišić T., Z. R. C. I. P. J. R. B. & P. S. Studies of ochratoxin A-induced inhibition of phenylalanine hydroxylase and its reversal by phenylalanine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **167**, 132–139 (2000).
28. Ledley, F. D., Hahn, T. & Woo, S. L. Selection for phenylalanine hydroxylase activity in cells transformed with recombinant retroviruses. *Somat. Cell Mol. Genet.* **13**, 145–154 (1987).
29. Lander, E. S. The Heroes of CRISPR. *Cell* **164**, 18–28 (2016).
30. Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J. & Soria, E. Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *J. Mol. Evol.* **60**, 174–182 (2005).
31. Wiedenheft, B. *et al.* RNA-guided complex from a bacterial immune system enhances target recognition through seed sequence interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 10092–7 (2011).
32. Barrangou, R. *et al.* CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science (80-. )*. **315**, 1709–1712 (2007).

33. Burma, S., Chen, B. P. C. & Chen, D. J. Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair (Amst)*. **5**, 1042–1048 (2006).
34. Gaj, T., Gersbach, C. A. & Barbas, C. F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* **31**, 397–405 (2013).
35. Gehring, H. & Schroder, A. Thymidine secretion by cultured chicken embryo fibroblasts and NIH/3T3 cells: quantification and time course. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **177**, 259–264 (1991).
36. Spilsberg, B., Rise, F., Petersen, D. & Nissen-Meyer, J. Thymidine secretion by hybridoma and myeloma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **342**, 221–226 (2006).
37. Baldi, L., Hacker, D. L., Adam, M. & Wurm, F. M. Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives. *Biotechnol. Lett.* **29**, 677–684 (2007).
38. Li, F., Vijayasankaran, N., Shen, A. (Yijuan), Kiss, R. & Amanullah, A. Cell culture processes for monoclonal antibody production. *MAbs* **2**, 466–479 (2010).



# CAPITULO 6

## 6. RESULTADOS (IV): INTEGRACIÓN DIRIGIDA DE LOS GENES DE INTERÉS MEDIANTE TECNICAS DE EDICION GENÓMICA:

### 6.1 Introducción

Durante la totalidad de los experimentos anteriores realizados en el presente trabajo de tesis doctoral, las líneas celulares estables seleccionadas, ya sea mediante los marcadores de selección tradicionales o metabólicos, han integrado las construcciones genéticas en su genoma de manera aleatoria o azarosa, también descrita en la literatura como “ilegítima”.

El método de integración ilegítima produce, tras la estabilización de la información genética usando el método correspondiente, una población heterogénea de células, con un número variable de copias de los genes de interés que, además, pueden estar integrados en lugares diferentes del genoma<sup>1</sup>. Este hecho comporta varias consecuencias de cara al uso productivo de estas células:

- En primer lugar, la expresión de un determinado gen integrado en un cromosoma viene dada, además de por los elementos genéticos del vector (como los ya estudiados en el presente trabajo en los capítulos anteriores), por el contexto genómico donde se ha realizado la integración. Como quiera que la mayoría del DNA del cual está compuesto el genoma (90%) no es codificante para ninguna proteína, es mucho más probable que durante una integración ilegítima, el DNA plasmídico que contenga el transgen de interés quede integrado en una zona de baja transcripción génica<sup>2</sup>. Este hecho tiene un efecto negativo en la productividad específica de las líneas celulares.
- Además de la productividad, la estabilidad de la expresión también se ve afectada por el contexto genómico, ya que existen zonas del genoma con más propensión que otras al silenciamiento epigenético (Metilación,

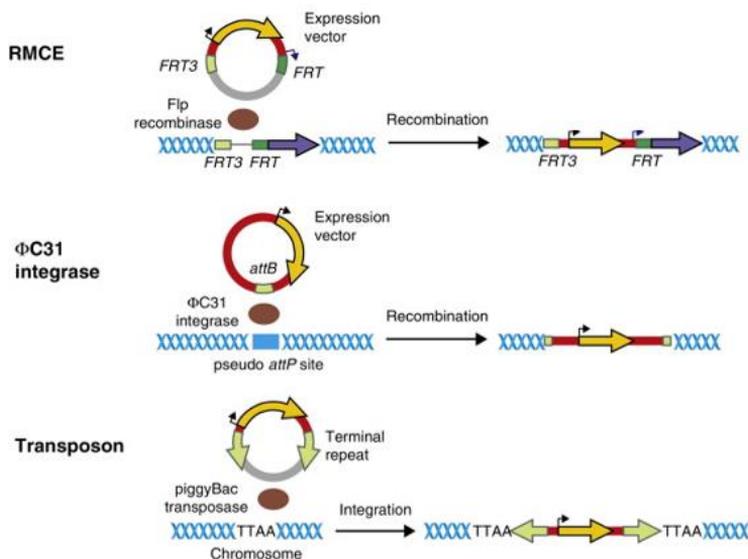
islas CpG, etc..) <sup>3</sup> o a recombinaciones que pueden dar lugar a la pérdida de la información genética del transgen.

Estas limitaciones conllevan la necesidad de realizar una separación celular con aislamiento clonal y posterior caracterización (en términos de número de copias integradas y estabilidad de la expresión) de los clones obtenidos para poder desarrollar una línea celular estable, aislando los clones más productores que se hayan podido generar por azar recurriendo al cribado *High-Throughput* de un gran número de candidatos <sup>4</sup>.

Por estas razones, las técnicas para conseguir la integración dirigida de una única copia gen de interés en una zona de alta expresión del genoma (*hotspot*) se han usado en la construcción de líneas estables, como medio para evitar los posibles efectos indeseables comentados anteriormente <sup>5</sup>.

La inserción dirigida única del gen de interés en el genoma de la célula o *Knock-in*, se puede llevar a cabo mediante diversas técnicas, que se pueden ver esquematizadas en la Figura 6.1

De los sistemas clásicos para *Knock-in*, sin duda el más popular es el intercambio de cassette mediante recombinasa <sup>6</sup> (RMCE, *Recombinase-mediated cassette Exchange*). Los sistemas RMCE, como Cre/loxP <sup>7</sup> or Flp/FRT <sup>8</sup> han sido referencia durante muchos años para realizar la sustitución de una secuencia definida en el genoma por otra secuencia de interés. Se basan en la preexistencia en el genoma de unas secuencias diana que también se encuentran en los extremos del plásmido donador. Al transfectar éste, junto con una recombinasa que reconoce las dianas de los extremos, se produce una recombinación que escinde la información genética entre ambas dianas y la intercambia por la del vector, que contiene el gen de interés. Esta estrategia se usa normalmente para realizar el intercambio de una proteína marcadora (eGFP), integrada en un *Hotspot*, por el gen de interés.

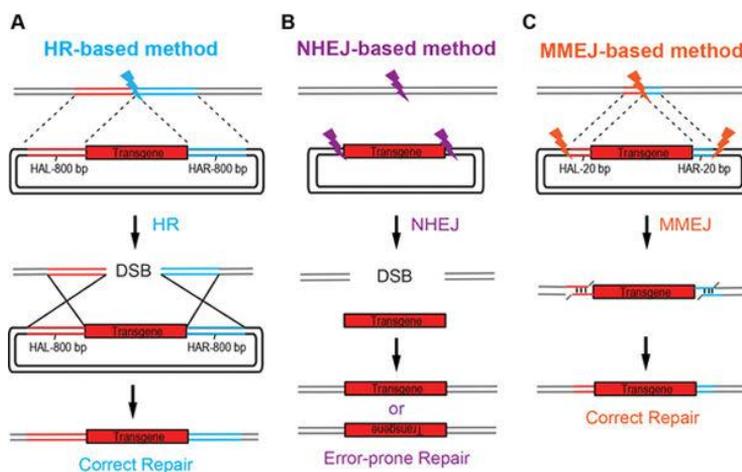


**Figure 6.1.** Algunos sistemas clásicos para la integración dirigida de copias únicas de un gen. RMCE funciona tras la creación de una línea celular hospedadora, diseñada con sitios FRT en un lugar adecuado de su genoma: se co-transfecta un vector con el gen de interés flanqueado por FRT y un segundo vector para la sobreexpresión de la recombinasa de Flp, que cataliza la integración del genoma. Integrasa ΦC31: la línea celular huésped se co-transfecta con un vector de expresión para la integrasa ΦC31 del fago y un vector para el gen de interés que contiene un sitio de recombinación attB. La integrasa ΦC31 se expresa y cataliza la recombinación del sitio attB con secuencias genómicas que se asemejan al sitio de recombinación attP (sitios pseudo attP). Transposasa: la línea celular huésped se cotransfecta con un vector de expresión para la transposasa del transposón piggyBac y un vector que contiene el gen de interés, flanqueado por las repeticiones terminales del transposón. La integrasa reconoce las repeticiones e integra la secuencia flanqueada en un sitio cromosómico TTAA. Adaptado de Konrad Büssiow<sup>9</sup>.

No obstante, en los últimos años, la popularización de las herramientas de edición genómica ha propiciado la aparición de una serie de técnicas alternativas que permiten conseguir el mismo efecto con mayor eficacia y flexibilidad. Este proceso se puede llevar a cabo con los sistemas de edición genómica anteriormente descritos en el capítulo anterior, como ZFN, TALEN o CRISPR<sup>10</sup>. En el caso del presente trabajo, se ha decidido utilizar el sistema CRISPR, en base a los criterios de flexibilidad y rendimiento anteriormente discutidos y debido a la buena experiencia obtenida durante el uso del sistema. La ventaja principal del sistema CRISPR sobre otros métodos como el RMCE recae en la alta flexibilidad<sup>11</sup>, su uso en células que no ha sido previamente modificadas con

secuencias especiales y la posibilidad de realizar la integración sin dejar rastro (Sistema *Scarless*)<sup>12</sup>

Al igual que para la realización del *knock-out*, (Capítulo 5) para la integración dirigida mediante los sistemas de edición genómica es necesario, en primer lugar, realizar un corte en la doble hebra de DNA con el fin de provocar la puesta en marcha de los procedimientos de reparación celular. A partir de este momento, varios son los escenarios que pueden dar lugar a la integración, que se describen a continuación (figura 6.2.):



**Figura 6.2. Métodos de integración del DNA según el mecanismo de reparación. HR (Recombinación homóloga) usa largas secuencias de hasta 800bp. NHEJ (Recombinación no homóloga) puede dar lugar a la integración del transgen en varias orientaciones. MMEJ (Unión de extremos mediante micro-homología) es similar a HR, usando unas secuencias de integración mucho más cortas (20bp). Extraído de Yao et al, 2017<sup>13</sup>.**

- HDR (*Homology-directed repair*)<sup>13</sup>: La integración del material genético se consiguen gracias a largas secuencias (aproximadamente de 800 pares de bases) que flanquean al transgen de interés, y que son homólogas con el punto del genoma en el que se desean integrar, produciéndose una recombinación homóloga de las mismas en la zona.
- NHEJ (*Non-homologous end joining*)<sup>14</sup>: Integración del material genético mediante la unión de extremos no homólogos. En este caso no es necesaria la presencia de zonas de homología, ya que la célula trata de reparar el daño causado con cualquier secuencia a su disposición,

pudiéndose producir una integración del transgen en cualquier orientación. Si bien este tipo de reparación puede ser más inespecífica y conducir a diversas formas de integración diferentes, este hecho no es relevante en la construcción de líneas celulares productivas, aunque sí en otras aplicaciones para las que se usan estos métodos, como las terapias genéticas.

- c) MMEJ (*Microhomology-mediated end joining*)<sup>15</sup>: Esta ruta de reparación, que ha sido descubierta y descrita más recientemente<sup>16</sup> que las dos anteriores, hace uso de unas cortas secuencias de homología de unos 20 pares de bases para conseguir la integración del transgen en el sitio de interés. Tanto este método como el NHEJ son más propensos a errores en forma de mutaciones y deleciones que la HDR, aunque este hecho no reviste especial importancia para la construcción de líneas celulares productivas, ya que los elementos importantes del vector suelen estar alejados de estas secuencias

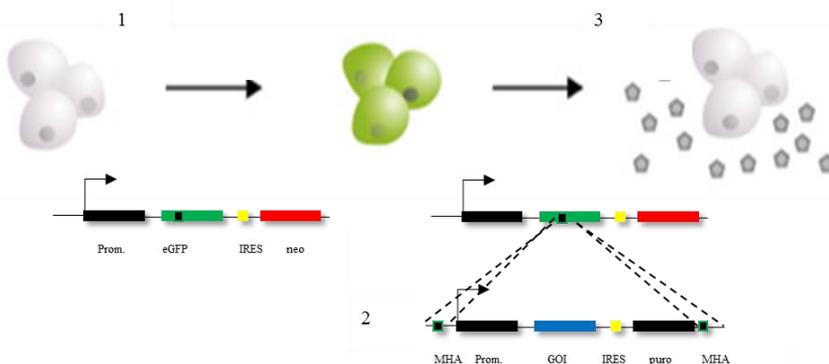
Tradicionalmente, la HDR ha sido el método de elección para realizar los *knock-in* en numerosos tipos celulares, incluyendo modificaciones realizadas con CRISPR<sup>17</sup>. No obstante, aunque pudiera parecer que siempre habría de ser el método más efectivo (debido a la extensa zona de homología), lo cierto es que la eficacia de las diferentes formas de reparación celular y las preferencias por una ruta u otra son dependientes de cada organismo. La estrategia MMEJ tiene ciertas ventajas sobre la estrategia HDR, como una mayor actividad durante la mayor parte del ciclo celular<sup>18</sup>. También cuenta con ventajas sobre la ruta NHEJ, al garantizar una reparación de mayor precisión<sup>13</sup>.

La elección de MMEJ como ruta preferencial de integración durante el presente trabajo para la integración dirigida en HEK293 ha estado justificada por este hecho y por la escasez de trabajos al respecto. La ruta HDR se ha descartado ya que es menos eficiente en varias líneas celulares humanas que la NHEJ, tal y como demuestra el trabajo de He et al<sup>19</sup>.

La estrategia que se ha definido usa la ruta MMEJ con el fin de conseguir la integración del vector de expresión. Para ello se usará una variante de la estrategia de integración de Thomas Auer et al en *Danio rerio*<sup>20</sup>, combinada con la sustitución de una eGFP en el cromosoma de un clon que la exprese en grandes cantidades, en modo análogo al sistema tradicional de RMCE<sup>9</sup>.

Durante los siguientes apartados, se desarrollarán los resultados obtenidos en las diferentes fases de desarrollo de un sistema de integración dirigida basado en CRISPR. Los pasos por dar para la realización de esta estrategia se encuentran resumidos en la figura 6.3. y son los siguientes:

1. Obtención mediante transfección ilegítima de una línea celular hospedadora que integre una sola copia del gen eGFP y que exprese la proteína en altas cantidades y de forma estable
2. Construcción de un vector de integración, con características que permitan la posterior selección de las células transfectadas.
3. Inserción, en la secuencia de eGFP, del gén de interés mediante la transfección simultánea de CRISPR contra la eGFP integrada ilegítimamente y el vector especialmente preparado con secuencias micro-homólogas.



**Figura 6.3. Estrategia para la integración dirigida de un gen de interés. En primer lugar, se genera una línea celular fluorescencia mediante transfección ilegítima (1), para, posteriormente, realizar una integración dirigida del cassette de expresión en la secuencia conocida de le eGFP (2), generando una línea productora (3)**

El fundamento de la estrategia se basa en la hipótesis de que el hecho de que una célula exprese eGFP en grandes cantidades y a partir de una ubicación única

estaría relacionado con la integración de este transgen en una zona genómica óptima de cara a su óptima transcripción<sup>21</sup> y, por tanto, la integración en este locus también sería beneficiosa para la expresión de las moléculas de interés que se pudieran integrar en dicha región.

## **6.2 Construcción y caracterización de la línea celular hospedadora.**

### **6.2.1. Selección clonal**

Como requisito inicial para poder llevar a cabo la estrategia anteriormente descrita, se ha realizado la construcción de una línea celular clonal de HEK293 que exprese eGFP con las siguientes características:

- a) Dentro la población celular, la línea celular aislada debe pertenecer al 5% de células que exprese eGFP más fluorescentes, con el fin de garantizar alguna ganancia en la expresión cuando se realice la integración dirigida del gen de interés.
- b) Debe haber integrado el menor número posible de copias de eGFP en su genoma, con el fin de facilitar la posterior integración dirigida del gen de interés, evitando heterogeneidades. El clon escogido debería tener una relación entre fluorescencia (RFU) y número de copias (CN) lo más alta posible.
- c) La expresión ha de mantenerse estable en el tiempo.

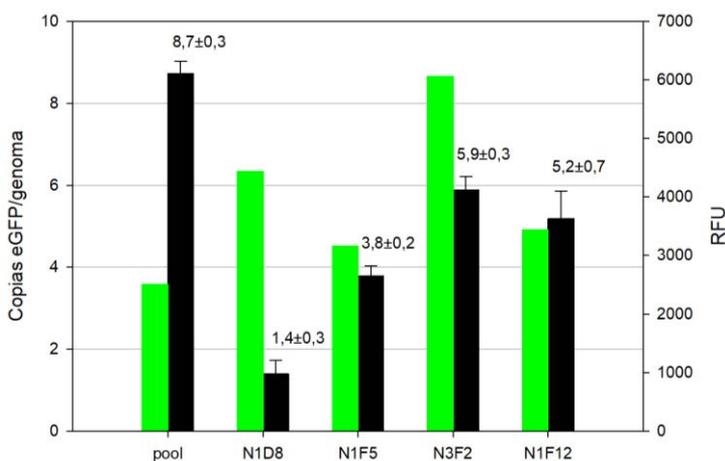
Para la construcción de la línea celular se ha empleado el vector peGFP\_IRESneo, análogo al pIRESpuro ya usado en otros apartados del presente trabajo, pero que usa el gen *nptIII*, que confiere resistencia al antibiótico Geneticina (G418), un derivado de la neomicina que afecta a células eucariotas. Esta decisión viene motivada por la necesidad de utilizar un marcador de selección diferente cuando se realice la integración del gen de interés.

Tras la transfección del vector y la selección utilizando este antibiótico, se realiza un aislamiento clonal en placas de 96 pocillos mediante *cell sorting* (Fig 6.4.A). En total se consiguió el aislamiento de 86 clones a partir de una sola ronda de *cell sorting*. De estos, 21 clones dieron lugar a líneas celulares estables capaces de



de integraciones múltiples o concatemerizaciones, que, sin embargo, no se traducen en una mayor producción de la proteína fluorescente.

De los clones caracterizados, se ha seleccionado el clon N1D8 para una posterior determinación de la zona de integración del transgen, debido a que presenta el menor número de copias del gen ( $1,4 \pm 0,3$ ) y el segundo mayor nivel de fluorescencia ( $4,2 \times 10^3$  RFU/cell). La productividad específica de esta línea celular es, aproximadamente, el doble que la del pool original ( $2,6 \times 10^3$  RFU/cell), siendo deseable un aumento similar de la productividad específica en las líneas que produzcan las moléculas de interés, una vez integradas en este mismo punto.



**Figura 6.5. Analisis del número de copias de eGFP (Barras negras) en comparación con la fluorescencia (Barra verde) en los diferentes clones testados.**

La producción de eGFP en la citada línea celular se mantiene estable en el tiempo incluso sin la presión selectiva proporcionada por el antibiótico G418. Esto se puede comprobar en la Fig. 6.6, en la que se observan los valores de fluorescencia durante el seguimiento durante un mes de la fluorescencia de la población mediante espectrofluorimetría en ausencia de presión selectiva.

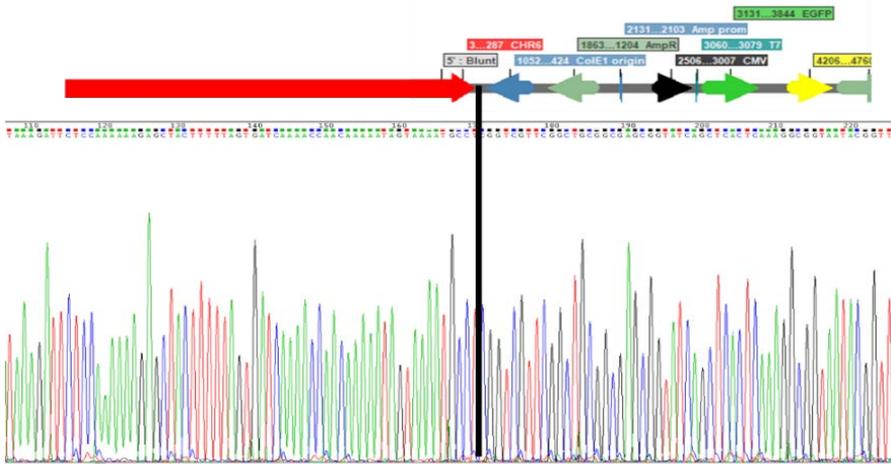
### **6.2.2. Caracterización del lugar de integración.**

Una vez seleccionada la línea celular hospedadora, se ha realizado la identificación de la zona de integración del transgen, con el fin de conocer el

contexto genómico de la misma y disponer de la máxima información posible para el momento en el que se realice la integración dirigida.

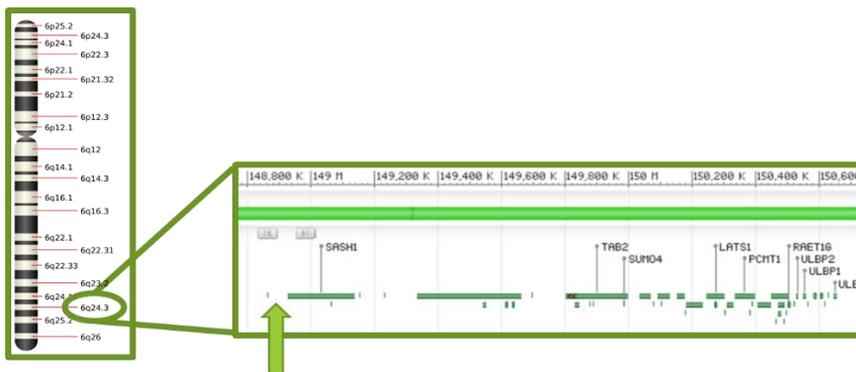
La identificación de la zona de integración se ha realizado mediante la técnica de PCR inversa (Ver Materiales y Métodos), descrita por. Brevemente, se ha extraído el DNA genómico de la línea N1D8 y se ha realizado una digestión de este con la enzima XhoI, que corta fuera de la zona codificante del vector. Posteriormente, se ha realizado una ligación de los fragmentos obtenidos, seguida de una PCR usando *primers* que hibridan en las zonas conocidas del vector, esperando encontrar la zona de contigüidad entre las secuencias del vector y las genómicas. El producto de PCR obtenido es después secuenciado y alineado contra la base de datos del genoma humano del NCBI (*Human assembly Ghr38*). Una descripción más a fondo de la técnica se puede encontrar en el capítulo 9.

Mediante esta técnica, se consiguió la identificación de una secuencia presente en el cromosoma 6 (chr6) contigua con una de las secuencias del vector peGFP\_IRESneo, usada para construir la línea celular. Con esta información, se diseñaron oligonucleótidos para realizar una PCR directa a partir del DNA genómico, usando un oligonucleótido que hibridaba en la zona prevista del cromosoma 6 (chr6) y otro que hibridaba en el vector peGFP\_IRESneo. En la Fig. 6.7 se puede observar el resultado de la secuenciación del producto de PCR obtenido, mostrando la zona de contigüidad entre la región cromosómica y la secuencia plasmídica. En la Fig. 6.8 se observa el contexto genómico.



**Figura 6.7:** Orientación relativa de los elementos del vector con respecto al cromosoma 6. La zona más cercana a la secuencia cromosómica es el origen de replicación ColE1.

El plásmido ha quedado integrado, mediante un corte en una zona cercana a la zona de origen de replicación de este (ColE1), en el brazo largo del cromosoma 6 (6q24.3). La zona no contiene ningún gen conocido, aunque se encuentra cerca del promotor del gen SASH1, codificante para una proteína relacionada con la cascada de señalización TLR4, estimulante de la producción de citoquinas y de la migración celular.



**Figura 6.8.** Contexto genómico del transgen en el brazo largo del cromosoma 6 (6q23.3)

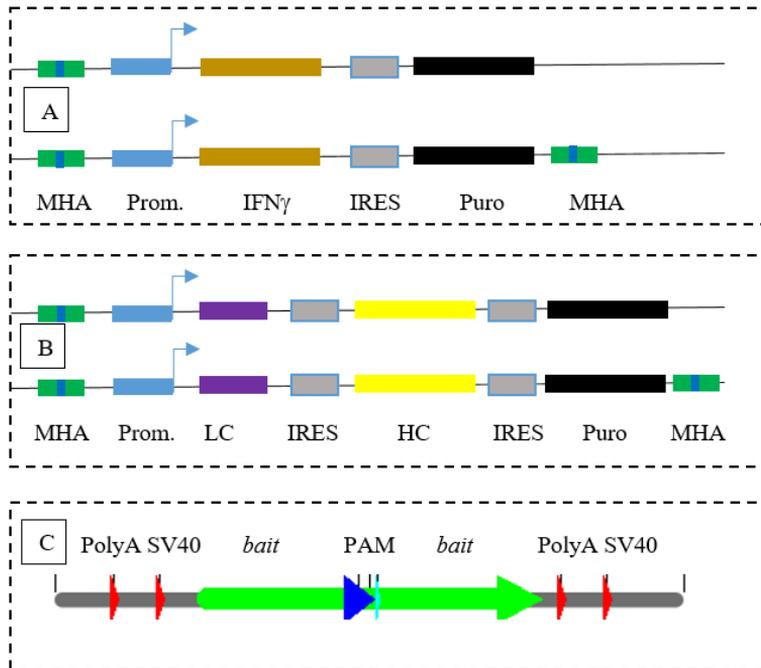
## 6.3 Integración dirigida de moléculas de interés

### 6.3.1. Arquitectura de los vectores.

Con el fin de realizar la integración dirigida, se han construido dos parejas de vectores para cada molécula de interés terapéutico (IFN $\gamma$  y trastuzumab). Los vectores están basados en el pIRESpuro3, con la adición de las zonas de microhomología y otros elementos que se detallan a continuación Fig (6.8 A y B):

- *Cassette* de expresión bicistrónico (IFN $\gamma$ ) o tricistrónico (trastuzumab)
- Secuencias microhomólogas con la eGFP (MHA) (6.8B), subdivididas en:
  - Zona de microhomología (*bait*): Su función es la de hibridar con la eGFP genómica mediante el mecanismo MMEJ
  - Zona PAM (*Promoter adjacent motif*) secuencia de 3 bases (Normalmente, 5'NGG3' en la que se producirá el corte por parte de CRISPR/Cas9, linealizando el plásmido. Está precedida por 20 nucleótidos que serán la diana de reconocimiento del sgRNA
- Zonas de parada transcripcional: Contienen una doble secuencia de Poliadenilación del virus SV40 para la parada de la transcripción tanto en la hebra (+) como en la (-), dependiendo de la orientación de la integración.

Se han construido dos versiones de cada vector (pBait1 y pBait2), siendo la principal diferencia entre cada uno de ellos la inclusión de 1 o 2 zonas MHA, bien flanqueando el cassette de expresión o bien solo en un punto del vector. Estas dos estrategias se han probado para verificar los posibles efectos diferenciales que puede tener en la eficiencia de integración el hecho de integrar todo el vector o solo la parte que contiene las secuencias de interés, ya que trabajos referenciados en la literatura ya han demostrado una diferencia significativa en ambas aproximaciones<sup>20</sup>.



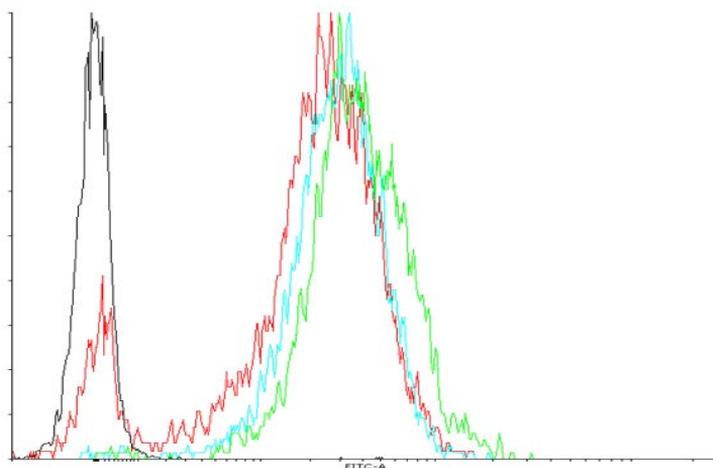
**Figura 6.8. Vectores usados para la integración dirigida y la expresión de IFN $\gamma$  (A) y trastuzumab (B), con una o dos zonas de microhomología MHA. Detalle de la zona de microhomología MHA, con sus principales componentes (C)**

El protocolo de integración consiste en la co-transfección simultánea de uno de los vectores pBait junto con el vector pCas9\_sgGFP que contiene la nucleasa Cas9 y un sgRNA contra la secuencia codificante de la eGFP (sg30RNA, ver anexo). La expresión intracelular de este conjunto daría lugar a un corte tanto en la secuencia de eGFP integrada en el genoma como en el vector pBait co-transfectado. Esto pondría en marcha los mecanismos de reparación celular, conduciendo, hipotéticamente, a la integración del vector en el lugar deseado mediante el mecanismo de MMEJ. Debido a la presencia de elementos de parada transcripcional y a la propia disrupción producida por la integración del nuevo material genético, la expresión de la eGFP por parte de la línea N1D8, así como la de la resistencia a Neomicina que lleva aparejada, quedarían interrumpidas, permitiendo una primera selección de clones con integración positiva mediante el aislamiento de los clones no fluorescentes.

### 6.3.2. Comparativa de estrategias de integración

Tras realizar la co-transfección de los vectores indicados en el apartado anterior junto con el vector pCas9\_eGFP, y realizar la selección estable utilizando puromicina, se han caracterizado las poblaciones celulares obtenidas mediante citometría de flujo.

En primer lugar, el análisis se ha centrado en observar la diferencia en cuanto al nivel de fluorescencia mostrado por las diferentes poblaciones celulares (Fig 6.9). Se puede observar un comportamiento diferente frente a la transfección de los distintos elementos en la población superviviente a la selección.



**Figura 6.9. Histograma mostrando la fluorescencia de las células N1D8 en varias condiciones: Transfección de psCas9\_sgRNA (Rojo), transfección de psCas9\_sgRNA+ selección con G418 (Azul), transfección de psCas9\_sgRNA + pBait1+ selección con puromicina (Negro), células no transfectadas (Verde)**

La población sobre la que se ha realizado la co-transfección de CRISPR más el plásmido integrativo pBait 1.0 ha perdido completamente la fluorescencia, como resultado probable de la integración del vector en el locus genómico donde se encuentra la eGFP.

Si bien este es un resultado esperado, es destacable la casi total ausencia (1% para pBait1\_IFN $\gamma$  y 5% para pBait1\_iTZM) de células transfectadas de manera azarosa (no dirigida) que sean resistentes a puromicina y, a la vez, fluorescentes.

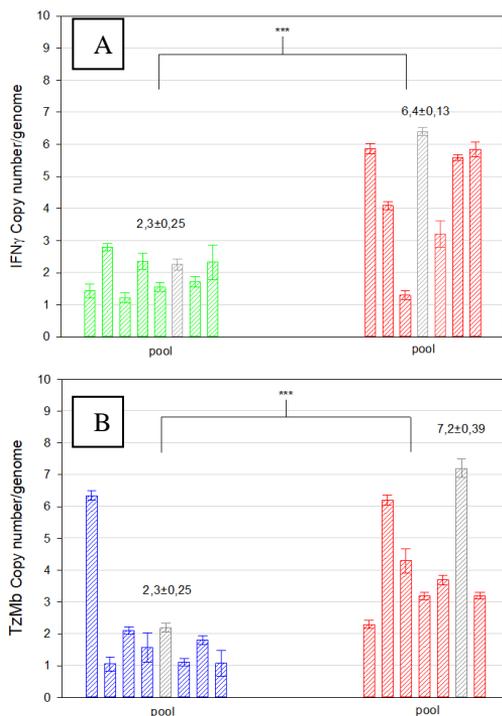
Los controles de células transfectadas solo con el sistema de edición genómica (sin plasmido integrativo) muestran los efectos atribuibles exclusivamente a esta condición: Las células N1D8 editadas presentan dos poblaciones, una de ellas fluorescente y resistente a G418 (células no editadas) y otra no fluorescente y sensible al antibiótico (15% del total). Estos dos resultados combinados demostrarían una gran efectividad del sistema diseñado a la hora de integrar de manera selectiva el gen de interés en el locus deseado, extremo que se comprobará de manera específica en el siguiente apartado.

Por otra parte, no ha sido posible aislar una población resistente a puromicina a partir de las células transfectadas con los vectores pBait2, con dos secuencias flanqueantes microhomologas. La razón de este hecho no ha podido ser determinada, pero a la vista de la efectividad de los vectores pBait1, se ha continuado el trabajo con las poblaciones obtenidas usando este vector.

### **6.3.3. Aislamiento clonal y comprobación de la especificidad de la integración**

Para verificar la especificidad de la integración, se llevó a cabo, en primer lugar, un aislamiento clonal a partir de las poblaciones transfectadas con los vectores pBait1\_IFN $\gamma$  y pBait1\_iTZM y se compararon con células HEK293 normales transfectadas de forma ilegítima con los mismos vectores. Para realizar el aislamiento se ha usado la técnica de separación celular mediante *cell sorting* en placas de 96 pocillos, aislando clones de la población no fluorescente (99-95% del total de la población). Se han obtenido 8 clones a partir de la población pBait1\_IFN $\gamma$  y 7 clones de pBait1\_iTZM. Una vez propagados los clones, se ha realizado una extracción de DNA genómico para verificar la especificidad de la integración. Para verificar esta especificidad se han dilucidado dos factores:

1. Verificación del número de copias integradas: Mediante qPCR (Fig. 6.10):



**Figura 6.10. Comparación del número de copias integradas de los genes de IFN $\gamma$  (A) y trastuzumab (B), según el método de integración: Dirigida (Izquierda) o ilegítima (Derecha). Las poblaciones originales de cada condición están representadas por una barra negra. Los resultados mostrados corresponden a la media más la desviación típica de 3 replicados.**

Los resultados obtenidos muestran que, tanto las poblaciones celulares, como los clones individuales aislados tras aplicar protocolos de integración dirigida, presentan un número de copias menor (Entre 1-2 copias/genoma), en comparación con las células obtenidas mediante transfección ilegítima (6-7 copias/genoma). Este último hecho (Gran número de copias integradas de forma ilegítima) ya había sido observado durante la construcción de la población original fluorescente. Además, se observa una mayor heterogeneidad en las poblaciones transfectadas azarosamente, con números de copias dispares.

2. Verificación de la precisión en la integración: Mediante PCR más secuenciación directa del genoma en las zonas previstas de integración (locus eGFP en posición 6q24.3) (Fig. 6.11):

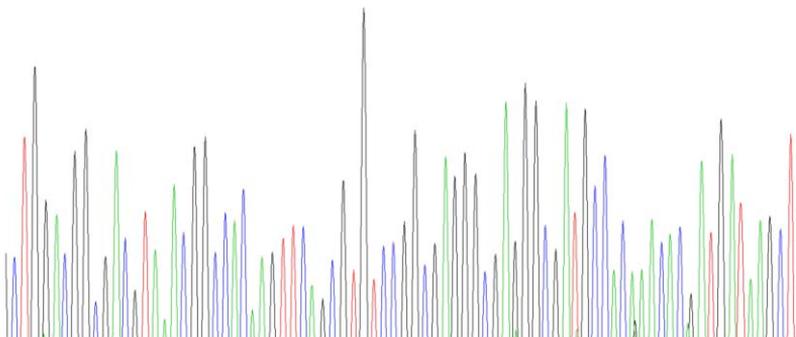
eGFP genómica
Diana sgRNA
PAM

```

CTGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGTGACCCCT
CTGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCC-----ACAACACGATGATAAGCT
CTGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACAACAACACGATGATAAGCT

```

Secuencia pBait1



**Figura 6.11. Secuenciación Sanger a partir del genoma de la línea celular HEK/N-I2D7, productora de IFN $\gamma$  (Secuencia superior y cromatograma) . Alineamiento con la secuencia genómica de la línea parental N1D8 (secuencia superior)**

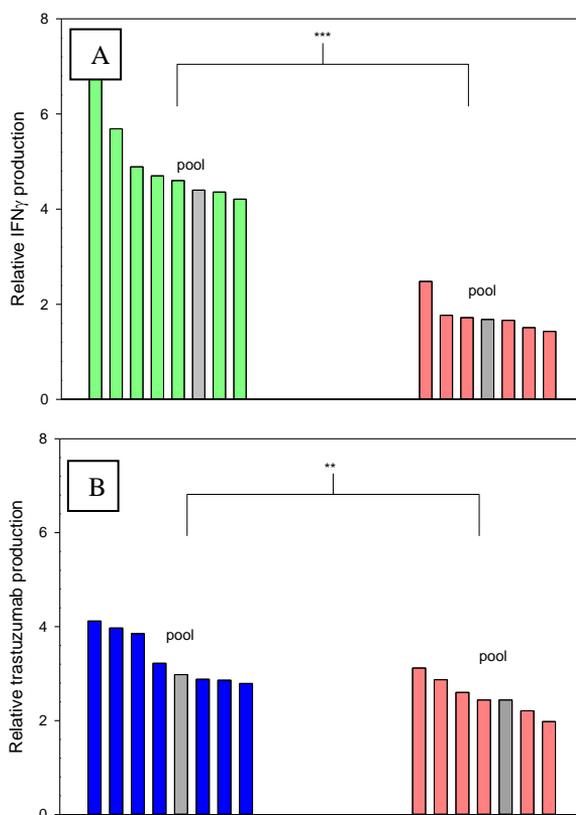
Se ha intentado la secuenciación de 4 de los clones que habían integrado solo 1 copia, según los resultados de qPCR. No obstante, tan solo en uno de ellos fue posible realizar una PCR más secuenciación, debido a la presencia de *primers-dimers* o amplificaciones inespecíficas en el resto de casos. En la secuencia obtenida a partir del clon N-I2D7, se ha podido determinar que la integración del plásmido donante se ha producido a nivel de la zona esperada, con una delección de 7 pares de bases correspondientes al PAM y parte de la secuencia de reconocimiento del sgRNA. No obstante, la integración del vector se ha producido en por una zona diferente a la esperada (gen de resistencia a ampicilina, AmpR), en lugar de por la zona de microhomología MHA.

### **6.3.4. Efecto de la integración dirigida en la producción específica de los productos problema**

Con el fin de comparar la productividad específica de los clones obtenidos y de realizar un cribado para seleccionar los más productores, se recurrió a la técnica de “captura en frío” (materiales y métodos). Esta técnica permite la estimación de la productividad específica de una determinada célula mediante el uso de anticuerpos marcados con fluorocromos dirigidos contra las moléculas de interés

que están expuestas en la membrana celular durante el proceso de secreción de las mismas. El proceso se lleva a cabo en frío, para ralentizar la secreción y dar tiempo al anticuerpo a unirse a su antígeno. La medición de la cantidad de producto producido se realiza mediante citometría de flujo. El procedimiento está descrito en el capítulo 9.

Los clones obtenidos usando tanto pBait1\_IFN $\gamma$  como pBait1\_iTZM se sometieron a este tipo de análisis, siendo comparados con los clones obtenidos a partir de células transfectadas mediante integración azarosa (poblaciones celulares generadas y descritas en el capítulo 3) (Fig 6.12)



**Figura 6.12.** Comparación de la producción específica relativa de IFN $\gamma$  (A) y trastuzumab (B), según el método de integración: Dirigida (Izquierda) o ilegítima (Derecha). Las poblaciones originales de cada condición están representadas por una barra gris.

En el caso del IFN $\gamma$ , la integración dirigida produce un aumento estadísticamente significativo de la producción específica, visible en la población original (antes de la selección clonal) (Fig. 6.12A). La población obtenida mediante integración dirigida presenta una productividad unas 2,5 veces superior al pool obtenido mediante transfección ilegítima, diferencia que se mantiene entre los clones más productores.

Al igual que en el caso anterior, el estudio de la integración dirigida en la producción de trastuzumab también mejora la productividad específica de los clones de una manera estadísticamente significativa con respecto a la integración azarosa, aunque el efecto obtenido en este caso es mucho menos pronunciado (Fig. 6.12B).

Las poblaciones celulares seleccionada tras la integración dirigida presentan una producción específica un 30% superior a las poblaciones construidas mediante integración azarosa.

En ambos casos, la mayoría de los clones muestran una producción específica comparable o similar a la de la población original de que fueron aislados, aunque los más productores (5-10% del total) presentan producciones específicas de casi el doble con respecto a la población original. En cualquier caso, se mantienen las mismas diferencias relativas entre los clones más productores (TOP3) aislados de cada una de las poblaciones.

#### **6.4. Conclusiones**

Durante el presente capítulo, se ha propuesto y llevado a cabo la construcción de líneas celulares productoras de las moléculas de interés mediante técnicas de integración dirigida usando modernos métodos de edición genómica.

La edición genómica y la integración dirigida de los genes de interés en locus conocidos del genoma de la línea celular proporciona un nivel superior de control y reproducibilidad a la hora de afrontar la construcción de una línea celular productora<sup>23</sup>. Por esta razón, el uso de estas técnicas novedosas para el desarrollo de nuevas líneas productoras está en auge actualmente.

La aproximación utilizada en el presente trabajo es una combinación del método de Thomas Auer et al<sup>20</sup> para la integración de genes en un modelo de pez cebra mediante el uso de CRISPR/Cas9, junto con el más tradicional uso de una línea que sobreexpresa eGFP para aprovechar el locus de integración ilegítima óptimo de la eGFP, con el fin de aumentar la productividad específica de la línea celular productora de proteínas recombinantes. Los resultados obtenidos permiten avalar la eficacia del método basado en CRISPR aquí presentado para el desarrollo de líneas productoras de interés en la industria biofarmacéutica. El uso del mismo ha proporcionado líneas celulares productoras de IFN $\gamma$  y Trastuzumab que heredan las características productivas de la línea hospedadora, es decir, 1) una producción específica duplicada con respecto a la población transfectada azarosa o ilegítimamente y 2) unos parámetros de crecimiento que no se han visto afectados por la modificación genética efectuada.

La técnica implementada en el presente trabajo permite una integración dirigida con una alta eficacia, minimizando hasta extremos negligibles la presencia de células transfectadas aleatoriamente o con integraciones ilegítimas y permitiendo con ello unos tiempos de desarrollo de la línea celular mucho más cortos que los que se obtienen al aplicar procedimientos estándares.

Además, a las características de la línea celular hospedadora antes reseñada se ha de añadir que dicha línea ha sido caracterizada en cuanto a su lugar de integración y el número de copias integradas. Las regulaciones actuales incentivan el uso de líneas celulares bien caracterizadas en este aspecto particular<sup>24</sup>, demandando la mayor cantidad de información posible acerca de la modificación genética realizada<sup>25</sup>. Este hecho proporciona una ventaja adicional a construir líneas celulares usando la técnica descrita en el presente trabajo, ya que los genes de las moléculas productoras simplemente sustituyen al gen de eGFP, manteniendo inalterado el resto del genoma, como se ha mostrado anteriormente.

Como conclusión, en el presente capítulo se ha construido y puesto a punto una herramienta de edición genómica que permiten el desarrollo de líneas celulares con características ventajosas de cara a la producción específica de proteínas de interés terapéutico, como fin a la serie de capítulos destinada a la mejora de la

productividad específica de las líneas celulares mediante modificaciones genéticas de diversa índole. Durante el próximo capítulo, se ensayarán los procesos productivos de las moléculas de interés terapéutico cultivando las líneas celulares desarrolladas en biorreactores para definir los sistemas productivos y comprobar que las líneas generadas se comportan de la misma manera que en los estudios a pequeñas escalas en sistemas no optimizados que en biorreactores preindustriales.

## 6.5 Referencias

1. Würtele, H., Little, K. C. E. & Chartrand, P. Illegitimate DNA integration in mammalian cells. *Gene Ther.* **10**, 1791–1799 (2003).
2. Neville, J. J., Orlando, J., Mann, K., McCloskey, B. & Antoniou, M. N. Ubiquitous Chromatin-opening Elements (UCOE)s: Applications in biomanufacturing and gene therapy. *Biotechnol. Adv.* **35**, 557–564 (2017).
3. Pikaart, M. J., Recillas-Targa, F. & Felsenfeld, G. Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators. *Genes Dev.* **12**, 2852–62 (1998).
4. Browne, S. M. & Al-Rubeai, M. Selection methods for high-producing mammalian cell lines. *Trends Biotechnol.* **25**, 425–432 (2007).
5. Fukushige, S. & Sauer, B. Genomic targeting with a positive-selection lox integration vector allows highly reproducible gene expression in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 7905–9 (1992).
6. Inniss, M. C. *et al.* A novel Bxb1 integrase RMCE system for high fidelity site-specific integration of mAb expression cassette in CHO Cells. *Biotechnol. Bioeng.* **114**, 1837–1846 (2017).
7. Song, A. J. & Palmiter, R. D. Detecting and Avoiding Problems When Using the Cre–lox System. *Trends Genet.* **34**, 333–340 (2018).
8. Baser, B., Spehr, J., Büsow, K. & van den Heuvel, J. A method for specifically targeting two independent genomic integration sites for co-expression of genes in CHO cells. *Methods* **95**, 3–12 (2016).
9. Bü, K. Stable mammalian producer cell lines for structural biology. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **32**, 81–90 (2015).
10. Gaj, T., Gersbach, C. A. & Barbas, C. F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* **31**, 397–405 (2013).
11. Phan, Q. V., Contzen, J., Seemann, P. & Gossen, M. Site-specific

- chromosomal gene insertion: Flp recombinase versus Cas9 nuclease. *Sci. Rep.* **7**, 17771 (2017).
12. Steyer, B. *et al.* Scarless Genome Editing of Human Pluripotent Stem Cells via Transient Puromycin Selection. *Stem Cell Reports* **10**, 642–654 (2018).
  13. Yao, X. *et al.* Homology-mediated end joining-based targeted integration using CRISPR/Cas9. *Cell Res.* **27**, 801–814 (2017).
  14. Chang, H. H. Y., Pannunzio, N. R., Adachi, N. & Lieber, M. R. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 495–506 (2017).
  15. Aida, T. *et al.* Gene cassette knock-in in mammalian cells and zygotes by enhanced MMEJ. *BMC Genomics* **17**, 979 (2016).
  16. McVey, M. & Lee, S. E. MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends Genet.* **24**, 529–538 (2008).
  17. Lee, J. S., Grav, L. M., Lewis, N. E. & Fastrup Kildegaard, H. CRISPR/Cas9-mediated genome engineering of CHO cell factories: Application and perspectives. *Biotechnol. J.* **10**, 979–994 (2015).
  18. You, Z. & Bailis, J. M. DNA damage and decisions: CtIP coordinates DNA repair and cell cycle checkpoints. *Trends Cell Biol.* **20**, 402–409 (2010).
  19. He, X. *et al.* Knock-in of large reporter genes in human cells via CRISPR/Cas9-induced homology-dependent and independent DNA repair. *Nucleic Acids Res.* **44**, e85–e85 (2016).
  20. Auer, T. O., Duroure, K., De Cian, A., Concordet, J.-P. & Del Bene, F. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair. *Genome Res.* **24**, 142–53 (2014).
  21. Estes, S. & Melville, M. in 11–33 (Springer, Berlin, Heidelberg, 2013). doi:10.1007/10\_2013\_260
  22. Derouazi, M. *et al.* Genetic characterization of CHO production host DG44 and derivative recombinant cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **340**, 1069–1077 (2006).
  23. Rehberger, B. *et al.* Accelerating stable recombinant cell line development by targeted integration. *BMC Proc.* **7**, P111 (2013).
  24. Garrels, W. *et al.* Identification and re-addressing of a transcriptionally permissive locus in the porcine genome. *Transgenic Res.* **25**, 63–70 (2016).

25. McHughen, A. & Smyth, S. US regulatory system for genetically modified [genetically modified organism (GMO), rDNA or transgenic] crop cultivars. *Plant Biotechnol. J.* **0**, 071024233955001 (2007).



# CAPITULO 7

## 7. RESULTADOS (V): EFECTO DEL CO<sub>2</sub> EN LA PRODUCCIÓN DE IFN $\gamma$ EN BIOREACTOR

### 7.1 Introducción

Durante el trabajo de tesis, las líneas celulares obtenidas en los capítulos anteriores se han cultivado usando el sistema de cultivo en *Shake-flask* (Ver capítulo 9) con el fin de comprobar sus características de crecimiento y producción. Este es un paso necesario para la posterior definición de los procesos en biorreactor, aunque se considera un método de cultivo no optimizado en comparación con este, ya que no se tiene monitoreo y control de las variables de cultivo. No obstante, el paso de escalado de matraz a biorreactor no es siempre directo, y cabe la posibilidad de que el proceso no se desarrolle como estuviera previsto, lo que justifica la realización del presente capítulo.

Durante el trabajo, tras caracterizar el cultivo en matraz, se ha realizado el escalado y optimización de la producción de las moléculas de interés terapéutico en biorreactor, sistema este que, como se comentaba en el capítulo 1, es el más utilizado para la producción a escala industrial.

Una de las desventajas de las células HEK293, así como la de la mayoría de células animales, es el ineficiente metabolismo mostrado durante el crecimiento en condiciones usuales de cultivo, caracterizadas por el alto consumo de glucosa, juntamente con la producción de grandes cantidades de lactato, hasta llegar a límites inhibitorios<sup>1</sup>. Bajo ciertas condiciones fisicoquímicas, el metabolismo celular puede tornarse más eficiente, siendo consumidos simultáneamente la glucosa y el lactato, teniendo este hecho un efecto positivo en la densidad celular y en los títulos de producto alcanzados<sup>2</sup>.

Este efecto ha sido observado en otras líneas celulares industriales, como CHO<sup>3</sup> y NS0<sup>4</sup>. No obstante, las condiciones de cultivo son determinantes para que se lleve a cabo este cambio metabólico.

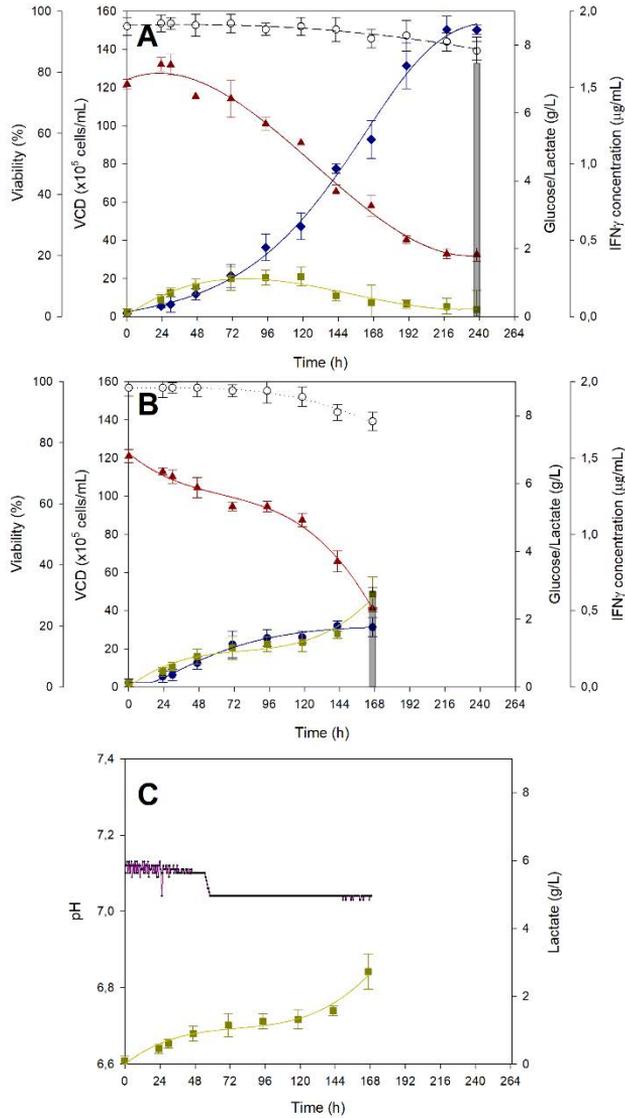
Sobre esta base, se encuadran los resultados obtenidos en el presente capítulo, en el cual se ha llevado a cabo una investigación sobre la influencia combinada del pH y del CO<sub>2</sub> sobre el crecimiento y la producción de las células HEK293 productoras de IFN $\gamma$ , cultivadas en biorreactor.

## **7.2 Resultados**

### **7.2.1. Cultivo de HEK293\_IFN $\gamma$ en procesos en batch en biorreactor de 2L y matraz agitado en condiciones de pH controlado.**

Se han llevado a cabo cultivos paralelos en biorreactor de 2L y en matraz agitado partiendo del mismo inóculo. En el biorreactor, se ha usado el control de pH para mantener el pH a  $7,1 \pm 0,05$  mediante la adición automatizada de NaOH (0,5M). Se han muestreado diariamente los cultivos para la determinación del recuento celular y las concentraciones de glucosa, lactado y IFN $\gamma$

Como se evidencia en la figura 7.1, las diferencias de comportamiento entre ambos sistemas son notables. Los cultivos en matraz agitado llegaron a una MDC de  $1,50 \pm 0,03 * 10^7$  cell/mL tras 240 horas, mostrando una fase inicial de consumo de glucosa y producción de láctico. A las 72-96h de cultivo, se produce el cambio metabólico hacia el co-consumo. (Fig. 7.1A)



**Figura 7.1 Cultivos en batch en *shake flask* y Biorreactor en condiciones de pH controlado. Recuento celular (●), título de hIFN $\gamma$  (barra), glucosa (▲), lactato (■) y viabilidad (○) de las células HEK293SF-IFN $\gamma$  en el *shake flask* (A) o biorreactor con control de pH (B). Mediciones en línea del pH (línea morada) y acumulación de lactato en biorreactor (C). Los puntos y las barras de error representan el valor medio y la desviación estándar de 3 experimentos independientes (n = 3)**

En cambio, las células cultivadas en el biorreactor en condiciones de pH controlado (Fig.7.1C) no muestran indicaciones de cambio metabólico a lo largo del cultivo. Esta situación conlleva un mayor consumo de glucosa y una

pronunciada acumulación de lactato y, consecuentemente, la viabilidad celular baja del 90% a las 166h de cultivo, con una MDC de  $3,12 \pm 0,51 * 10^6$  cell/mL, un 20% de la densidad alcanzada en el matraz. Como consecuencia, la producción volumétrica de IFN $\gamma$  es mucho menor en el biorreactor (Aprox. un 39% de la alcanzada en el matraz) (Fig. 7.1B)

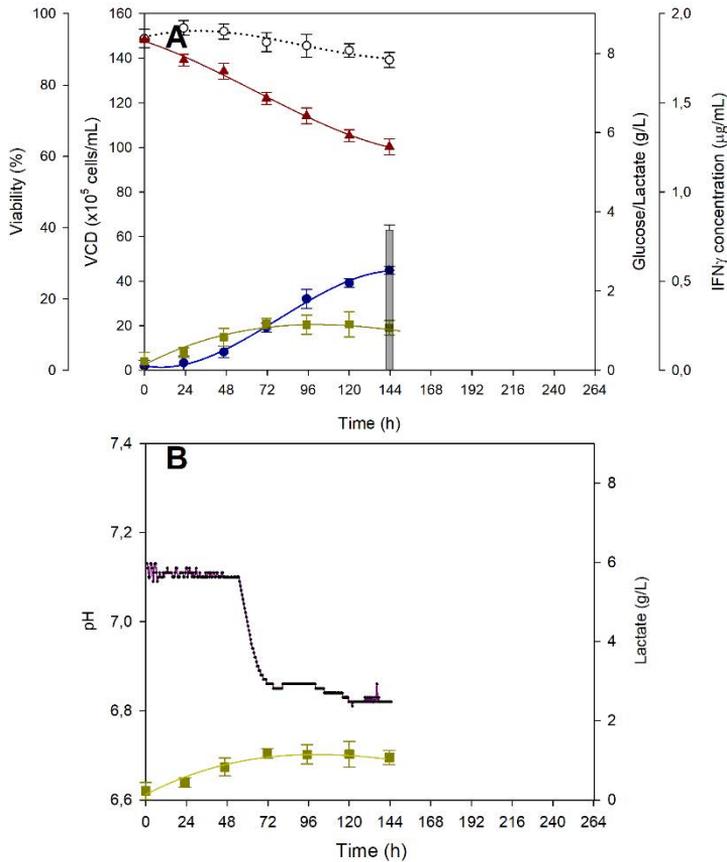
Los resultados obtenidos demuestran la importancia del pH para el cambio metabólico hacia el co-consumo de glucosa y lactato y la necesidad de optimizar el cultivo en biorreactor para lograr este cambio metabólico.

### **7.2.2. Cultivo de HEK293\_IFN $\gamma$ en procesos en batch en biorreactor de 2L y matraz agitado en condiciones de pH libre.**

Con el fin de reproducir más fielmente las condiciones de cultivo en un matraz agitado, se repitió el experimento anterior manteniendo desconectado en control de pH en el biorreactor, dejando libre el pH del medio de cultivo. Se esperaba con este experimento poder activar el cambio metabólico hacia co-consumo, mejorando la productividad del proceso.

En la Fig. 7.2A se pueden observar los resultados de este experimento en términos de crecimiento celular, consumo y generación de metabolitos y producción de IFN $\gamma$ . Por una parte, la densidad celular alcanza las  $4.48 \pm 0.17 * 10^6$  cell/mL, que mejora en un 30% la MDC alcanzada en condiciones de pH controlado, pero que sigue siendo un 53% inferior a la alcanzada en el matraz agitado. En términos de producción de IFN $\gamma$ , se observa una producción un 48% menor que en el matraz.

Estas diferencias en el crecimiento y producción pueden ser explicadas de nuevo por el comportamiento metabólico de las células. En la fig. 7.2B se muestra cómo, si bien las células cultivadas en estas condiciones si llevan a cabo un cambio metabólico hacia el co-consumo cuando el pH se acerca a 6,8, este hecho se manifiesta solo en la parada en la acumulación de lactato, sin que se produzca un co-consumo significativo en comparación con las células cultivadas en matraz.



**Figura 7.2. Cultivos en batch en Biorreactor en condiciones de pH libre (No controlado). Recuento celular (●), título de hIFN $\gamma$  (barra), glucosa (▲), lactato (■) y viabilidad (○) de las células HEK293SF-IFN $\gamma$  en el biorreactor con pH no controlado(A). Mediciones en línea del pH (línea morada) y acumulación de lactato en biorreactor (B). Los puntos y las barras de error representan el valor medio y la desviación estándar de 3 experimentos independientes (n = 3)**

Este comportamiento indica que, aparte del pH, otros factores son necesarios para el cambio metabólico hacia el co-consumo de glucosa y lactato. Como sea que en los cultivos en matraz agitado sí que se produce este cambio y que la única diferencia no probada hasta el momento entre un sistema de cultivo y otro es la atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5% (v/v) presente en el incubador, (pensada para el mantenimiento del pH en valores fisiológicos mediante el sistema de tampón

bicarbonato) se ha decidido evaluar el efecto de este parámetro en un cultivo en biorreactor.

### **7.2.3. Cultivo de HEK293\_IFN $\gamma$ en procesos en batch en biorreactor de 2L y matraz agitado en condiciones de pH libre y con una corriente de CO<sub>2</sub> al 1%.**

Con el fin de reproducir las condiciones de cultivo del matraz agitado, se decidió introducir un flujo constante de CO<sub>2</sub> al 1% (v/v) en la aireación del biorreactor durante todo el proceso de cultivo (Previamente, el CO<sub>2</sub> solo se usaba para ajustar el pH inicial, ver materiales y métodos). El uso de esta cantidad de CO<sub>2</sub>, en lugar del 5% presente en el incubador, viene determinado por la mayor eficiencia en la transferencia de gases que posee el biorreactor, gracias a que se airea el gas al medio de cultivo directamente a través de un difusor (*sparger*), en lugar de a través de la superficie del medio de cultivo, como ocurre en un matraz. Después de varios test, se encontró que una cantidad de CO<sub>2</sub> superior al 1% conllevaba una bajada inaceptable en el pH del medio de cultivo, debido a las propiedades acidificantes del CO<sub>2</sub> y la falta de control de pH en el biorreactor.

Los cultivos llevados a cabo en estas condiciones se comportan de una forma prácticamente exacta a los cultivos llevados a cabo en matraz agitado, como se muestra en la fig. 7.3. La densidad celular alcanzada es comparable ( $1.33 \pm 0.12 \cdot 10^7$  cell/mL vs  $1.50 \pm 0.3 \cdot 10^7$  cells/mL alcanzados en el matraz), así como los títulos de producto ( $1.52 \pm 0.01$   $\mu$ g/mL vs  $1.66 \pm 0.17$   $\mu$ g/mL en matraz) (Fig 7.3A). Además, el cambio metabólico hacia el co-consumo de glucosa y lactato se observa en el cultivo en biorreactor a las 72-96h, como se esperaba. Los perfiles de consumo son muy parecidos a los del matraz, mientras que las mediciones on-line de pH confirman este fenómeno, mostrando una subida progresiva hasta pH.7,0 después de este cambio metabólico. (Fig 7.3B)

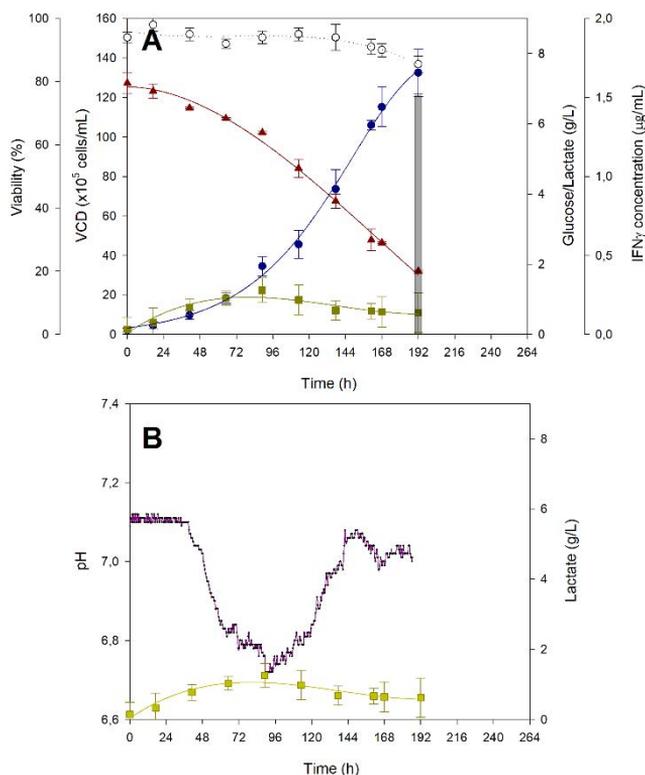


Figura 7.3. Cultivos en batch en Biorreactor en condiciones de pH libre (No controlado) + 1% de CO<sub>2</sub> en el aire de entrada. Recuento celular (●), título de hIFN<sub>γ</sub> (barra), glucosa (▲), lactato (■) y viabilidad (○) de las células HEK293SF-IFN<sub>γ</sub> en el biorreactor (A). Mediciones en línea del pH (línea morada) y acumulación de lactato en biorreactor (B). Los puntos y las barras de error representan el valor medio y la desviación estándar de 3 experimentos independientes (n = 3).

Tabla 5. Valores de MDC, concentración de producto y productividades obtenidos en los diferentes escenarios analizados

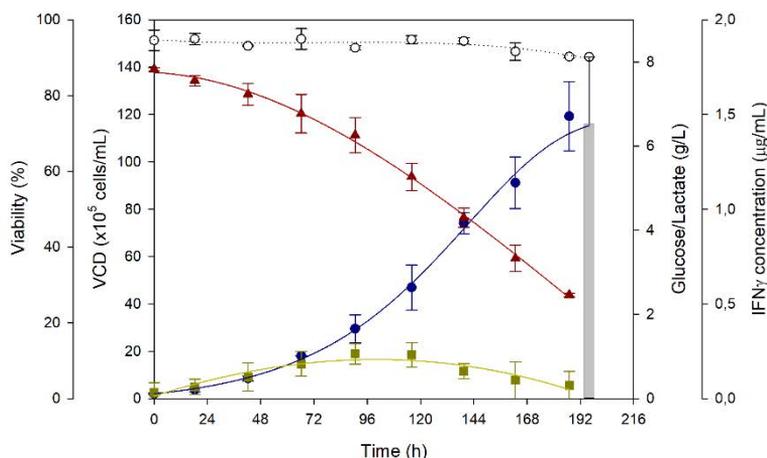
	Máxima densidad celular (x10 <sup>7</sup> cells/mL)	Concentración IFN <sub>γ</sub> (mg/L)	Productividad especifica (pg*cel*d)	Productividad volumétrica (ng IFN <sub>γ</sub> /mL·h)
<b>pH controlado</b>	0.31±0.05x10 <sup>7</sup>	0,62 ± 0,03	0,045	3,88
<b>pH libre</b>	0.45±0.02x10 <sup>7</sup>	0,78 ± 0,03	0,043	5,37
<b>pH libre + 1% CO<sub>2</sub></b>	1.33±0.12x10 <sup>7</sup>	1,51 ± 0,10	0,038	7,86
<i>Shake flask</i>	1.50±0.03x10 <sup>7</sup>	1,66± 0,17	0,039	8,65

En la Tabla 1 se encuentran resumidos los valores de MDC, concentración de producto y productividades obtenidos en los diferentes escenarios analizados durante la presente batería de experimentos.

#### 7.2.4. Escalado del proceso en planta piloto

La estrategia de cultivo basada en la alimentación continua de CO<sub>2</sub> fue puesta a prueba a escala piloto (Pre-industrial) usando un biorreactor de 50L de un solo uso (STR50, Sartorius). Los datos obtenidos se presentan en la figura 7.4, donde se observa el crecimiento celular, perfiles metabólicos y título final de producto. La MDC alcanzada ( $1.19 \pm 0.38 \times 10^7$  cell/mL) y los títulos de producto ( $1.45 \pm 0.01$  µg/mL) al final del cultivo igualan los obtenidos usando esta estrategia en biorreactor y matraz agitado, demostrando la escalabilidad del proceso desarrollado.

El cultivo fue detenido antes de que la viabilidad cayera por debajo del 90%, con el fin de proceder a la purificación del producto antes de que la acumulación de restos celulares y células muertas afectara al rendimiento del proceso y a los valores de pureza obtenidos.



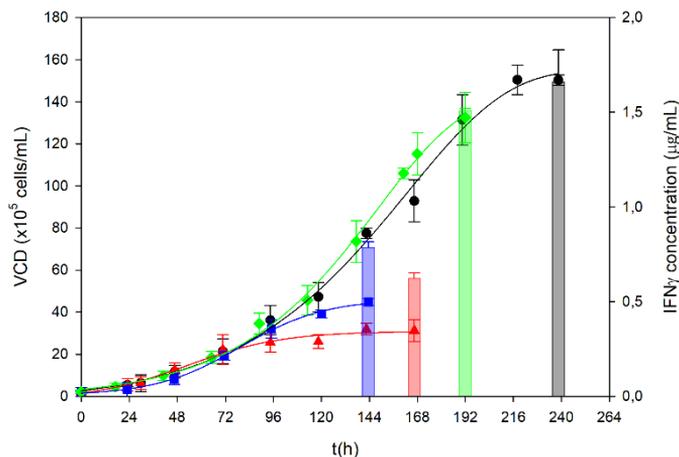
**Figura 7.** Cultivos en batch en Biorreactor de 50L de un solo uso en condiciones de pH libre (No controlado) +1% CO<sub>2</sub>. Recuento celular (●), título de hIFN $\gamma$  (barra), glucosa (▲), lactato (■) y viabilidad (○) de las células HEK293SF-IFN $\gamma$  biorreactor con pH no controlado(A). Mediciones en línea del pH (línea morada) y acumulación de lactato en biorreactor (B). Los puntos y las barras de error representan el valor medio y la desviación estándar de 3 experimentos independientes (n = 3).

### 7.3 Conclusiones

Durante el presente capítulo, se ha puesto de manifiesto la importancia de realizar una profunda caracterización en biorreactor de las líneas celulares candidatas a ser células productivas. Los resultados aquí mostrados señalan la significativa diferencia entre el cultivo en *shake flask* y el realizado en biorreactores en condiciones controladas, debido a los cambios metabólicos realizados por las células HEK293. Esta optimización es necesaria para aprovechar en su totalidad las mejoras de productividad específica que se hayan podido realizar previamente.

En los trabajos previos del grupo<sup>5</sup>, ya se había descrito como células HEK293 expresando eGFP y cultivadas bajo condiciones de pH libre conseguían, de manera consistente, llegar a mayores densidades celulares y productividades que las que se cultivaban en condiciones de pH controlado, relacionando el pH con el desencadenamiento del fenómeno del co-consumo de glucosa y lactato.

En el presente trabajo, se ha observado este mismo fenómeno en una línea celular que expresaba IFN $\gamma$ , confirmando que el pH es un factor mayor y necesario para el cambio metabólico. No obstante, el hecho de que los cultivos en biorreactor no lleguen a las densidades celulares alcanzadas en matraz agitado, incluso en condiciones de pH libre, demuestra la necesidad de la concurrencia de otro factor para que se dé un co-consumo completo que tenga efectos claros en la producción volumétrica de los cultivos. Los resultados descritos en este capítulo demuestran que, no solo el pH, sino una cantidad mínima de CO<sub>2</sub>, es necesaria para que las células puedan llevar a cabo este cambio metabólico desde la producción de lactato hacia su consumo neto, optimizando el metabolismo y permitiendo llegar a mayores densidades celulares y producciones volumétricas (Fig. 7.5)



**Figura 7.5. Comparación de la cinética de crecimiento y los títulos de hIFN $\gamma$  entre los diferentes experimentos en biorreactor de 2L: recuento de células (símbolos) y títulos de hIFN $\gamma$  (barras) para las diferentes configuraciones experimentales: matraz agitado (●), Biorreactor en condiciones de pH controladas (▲), Bioreactor en condiciones de pH no controlado (■) y vioreactor en condiciones de pH no controladas más 1% de flujo de CO $_2$  (◆)**

Tradicionalmente, la atmosfera de CO $_2$  usada en los incubadores para cultivo de células animales ha jugado un papel en el mantenimiento del pH fisiológico en el medio de cultivo, gracias al uso del sistema carbonato/bicarbonato. Este sistema permite neutralizar el ácido láctico producido por las células durante su crecimiento mediante la formación de H $_2$ CO $_3$  a partir del CO $_2$  ambiental<sup>6</sup>. No obstante, para el cultivo en biorreactores, el control del pH se suele realizar con adiciones automatizadas de soluciones correctoras (NaOH/HCl).

Aparte de su papel como regulador del pH del medio, el CO $_2$  puede influenciar en cultivo de diversas maneras, como, por ejemplo, afectando también al pH intracelular<sup>7</sup>, a la permeabilidad de la membrana<sup>8</sup> o al metabolismo<sup>9</sup>. Además, es producto o sustrato de múltiples reacciones enzimáticas<sup>10</sup>. Su presencia, por tanto, puede ser requerida por las células por varias razones.

El papel del CO $_2$  en los procesos industriales ha sido extensamente estudiado en varios trabajos, debido a la acumulación de este gas por la respiración de las células cuando se llegan a muy altas densidades en procesos en perfusión<sup>11,12</sup>. No obstante, no existen trabajos previos acerca de la influencia del CO $_2$  a bajas

densidades celulares, cuando la acumulación debido al metabolismo es demasiado baja para ser relevante. Es un hecho conocido que las concentraciones bajas de CO<sub>2</sub> pueden inhibir la actividad in-vivo en ciertas bacterias, como *Corynebacterium glutamicum*<sup>13</sup> o *E.coli*<sup>14</sup>, debido a limitaciones en reacciones anapleróticas. En estos casos, la adición de carbonatos o CO<sub>2</sub> mejoró el rendimiento del proceso<sup>15</sup>. Si el efecto observado en las células HEK293 está relacionado con estas reacciones o puede ser por otra causa, permanece por ser aclarado.

En conclusión, se ha demostrado que una corriente fija al 1% de CO<sub>2</sub> en el flujo de aireación en un biorreactor sin control de pH permite una reproducción de las condiciones encontradas en un matraz agitado, permitiendo a las células cultivadas de este modo alcanzar niveles equivalentes de MDC y productividad. El proceso resultante ha sido escalado directamente a escala piloto (50L) demostrando un comportamiento reproducible. Los resultados demuestran que el CO<sub>2</sub> es corresponsable, junto con el pH, en el cambio metabólico hacia el consumo de glucosa y lactato y que una mínima cantidad es necesaria para que las células HEK293 tengan un rendimiento de proceso óptimo, sin que hayan sido aclaradas las causas de este fenómeno. Los resultados, en conjunto, ponen de manifiesto la importancia del estudio y la optimización de los bioprocesos en cada paso del escalado hacia el nivel de producción industrial.

## 7.4 Referencias

1. Martínez, V. S. *et al.* Flux balance analysis of CHO cells before and after a metabolic switch from lactate production to consumption. *Biotechnol. Bioeng.* **110**, 660-666 (2013).
2. Liste-Calleja, L., Lecina, M. & Cairó, J. J. HEK293 cell culture media study towards bioprocess optimization: Animal derived component free and animal derived component containing platforms. *J. Biosci. Bioeng.* **117**, 471-477 (2014).
3. Altamirano, C., Paredes, C., Illanes, A., Cairó, J. . & Gòdia, F. Strategies for fed-batch cultivation of t-PA producing CHO cells: substitution of glucose and glutamine and rational design of culture medium. *J. Biotechnol.* **110**, 171-179 (2004).
4. Ivarsson, M., Noh, H., Morbidelli, M. & Soos, M. Insights into pH-induced metabolic switch by flux balance analysis. *Biotechnol. Prog.* **31**, 347-357 (2015).

5. Liste-Calleja, L. *et al.* Lactate and glucose concomitant consumption as a self-regulated pH detoxification mechanism in HEK293 cell cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 9951-60 (2015).
6. Eagle, H. Buffer combinations for mammalian cell culture. *Science* **174**, 500-3 (1971).
7. Hulikova, A., Vaughan-Jones, R. D. & Swietach, P. Dual role of CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>(-)</sup> buffer in the regulation of intracellular pH of three-dimensional tumor growths. *J. Biol. Chem.* **286**, 13815-26 (2011).
8. Harrison, R. A. P., Ashworth, P. J. C. & Miller, N. G. A. Bicarbonate/CO<sub>2</sub>, an effector of capacitation, induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. *Mol. Reprod. Dev.* **45**, 378-391 (1996).
9. deZengotita, V. M., Schmelzer, A. E. & Miller, W. M. Characterization of hybridoma cell responses to elevated pCO<sub>2</sub> and osmolality: intracellular pH, cell size, apoptosis, and metabolism. *Biotechnol. Bioeng.* **77**, 369-80 (2002).
10. Blombach, B. & Takors, R. CO<sub>2</sub> - Intrinsic Product, Essential Substrate, and Regulatory Trigger of Microbial and Mammalian Production Processes. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **3**, 108 (2015).
11. Brunner, M., Doppler, P., Klein, T., Herwig, C. & Fricke, J. Elevated pCO<sub>2</sub> affects the lactate metabolic shift in CHO cell culture processes. *Eng. Life Sci.* (2017). doi:10.1002/elsc.201700131
12. Zhu, M. M. *et al.* Effects of Elevated pCO<sub>2</sub> and Osmolality on Growth of CHO Cells and Production of Antibody-Fusion Protein B1: A Case Study. *Biotechnol. Prog.* **21**, 70-77 (2008).
13. Blombach, B., Buchholz, J., Busche, T., Kalinowski, J. & Takors, R. Impact of different CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> levels on metabolism and regulation in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **168**, 331-340 (2013).
14. Lu, S., Eiteman, M. A. & Altman, E. Effect of CO<sub>2</sub> on succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations. *J. Biotechnol.* **143**, 213-23 (2009).
15. Radoš, D. *et al.* Carbon flux analysis by <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance to determine the effect of CO<sub>2</sub> on anaerobic succinate production by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 3015-24 (2014).

# CAPITULO 8

## 8. CONCLUSIONES GENERALES

En la presente tesis doctoral se han desarrollado herramientas y metodologías para la obtención de líneas celulares humanas productoras de proteínas terapéuticas recombinantes con el fin de aumentar la producción específica, usando la línea celular humana HEK293 como sistema de expresión y como candidatos terapéuticos modelo el IFN $\gamma$  y el anticuerpo monoclonal trastuzumab.

A lo largo del trabajo realizado, se han obtenido líneas y poblaciones celulares que expresaban estas moléculas de interés de manera estable, que han servido como base para los desarrollos posteriores. Se han determinado los elementos genéticos óptimos para la expresión y secreción de las proteínas de interés y se ha desarrollado una metodología para la producción de estas proteínas en un medio libre de antibióticos. Asimismo, se han construido y explorado herramientas para la construcción de líneas celulares con mejores productividades mediante el uso de avanzadas técnicas de edición genómica. Finalmente, se han validado las líneas y estudiado y definido las variables de proceso en biorreactores con una de las líneas celulares obtenidas.

Del trabajo desarrollado y de los resultados obtenidos se puede concluir:

1. **Los elementos genéticos que regulan la expresión y secreción de las proteínas de interés tienen un impacto decisivo en la productividad específica de las células productoras.** Mediante el estudio de los promotores y péptidos señal óptimos, se ha conseguido un aumento de entre 3 y 5 veces en la producción específica de los procesos de producción del anticuerpo monoclonal trastuzumab. No obstante, se ha puesto de manifiesto el hecho de que los resultados que se pueden derivar del uso de esta estrategia son muy dependientes de la proteína expresada. En el caso de los diferentes promotores, existen numerosos trabajos<sup>1-5</sup> demostrando que la eficacia de los mismos es altamente dependiente de la línea celular. Lo mismo puede decirse de la eficacia de los diferentes péptidos señal<sup>6-9</sup>,

influenciada tanto por la línea celular, como por la proteína a expresar, como demuestran los resultados de este trabajo. De cara a futuros trabajos, la comprensión de los mecanismos últimos (moleculares)<sup>10-12</sup> que regulan y determinan la eficacia de un determinado péptido señal puede ayudar a la selección de los elementos óptimos para la producción y secreción de una proteína concreta, ya sea a partir de la determinación de señales naturales ya existentes, como en el caso del péptido señal del IFN $\alpha$ 2, o de la síntesis de péptidos señal sintéticos altamente eficientes. Así mismo, cabe la exploración de otros elementos genéticos que pueden ayudar a las mejoras en la productividad, tales como enhancers en los promotores<sup>13</sup>, regiones MARS<sup>14</sup>, aisladores cromatínicos<sup>15</sup>, UCOES<sup>16,17</sup>, etc...

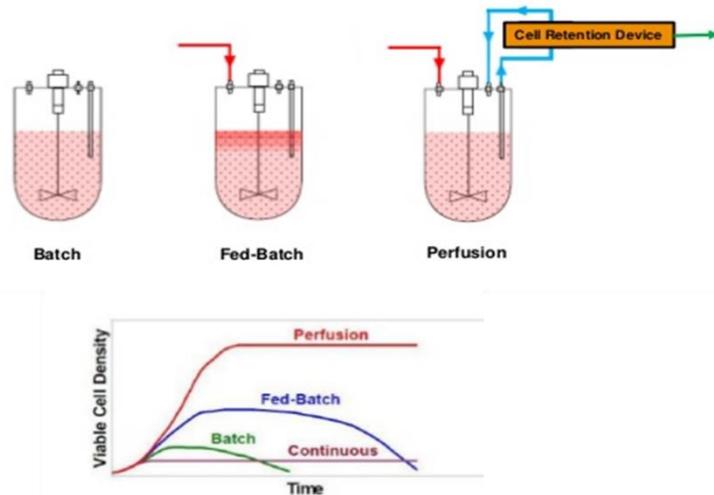
- 2. El uso de marcadores de selección metabólicos, que resultan ventajosos y recomendables para la expresión de proteínas terapéuticas por requisitos regulatorios y de productividad, es posible en las células HEK293.** Estos marcadores, como la Glutamina sintetasa y la Dihidrofolato reductasa, ampliamente usados en las líneas celulares de mayor uso industrial, como CHO<sup>18-20</sup> y NS0<sup>21</sup>, no son actualmente utilizados en HEK293 debido a que son incompatibles con los altos niveles de expresión endógena de estos genes<sup>22</sup>. No obstante, en el presente trabajo se ha demostrado la posibilidad de usar diferentes marcadores metabólicos de selección en HEK293, tanto aprovechando auxotrofías naturales (caso de la Fenilalanina hidroxilasa, PAH) como desarrollando líneas celulares auxotróficas mediante edición genómica (caso de la Glutamina sintetasa). Además, se ha probado la viabilidad para igualar e incluso superar los títulos de las proteínas de interés expresadas usando estos sistemas, en comparación con los sistemas tradicionales de selección mediante antibióticos. No obstante, las limitaciones encontradas durante el escalado de las células seleccionadas con PAH demuestran la necesidad de adoptar un enfoque múltiple a la hora de desarrollar marcadores de selección metabólicos, enfrentando, no solo los problemas selectivos que se puedan encontrar (caso de la timidilato sintetasa, TYMS), sino los efectos colaterales derivados del impacto metabólico que puedan tener los

marcadores de selección, como la falta de crecimiento observada durante el uso del sistema PAH. Futuros trabajos deben determinar las composiciones de medio más adecuadas<sup>23,24</sup> para obtener todo el provecho posible de este sistema de selección, potencialmente óptimo en la línea celular HEK293.

- 3. La integración dirigida de los genes de interés en un punto de transcripción elevada dentro del genoma celular permite la mejora de la productividad específica de las líneas celulares.** La técnica desarrollada en el presente trabajo, junto con la línea celular hospedadora, permiten la construcción de líneas celulares productoras (*Master cell lines*) con una menor heterogeneidad genómica de partida, con gran eficiencia en la integración del gen de interés en el punto deseado y con características productivas similares a las de la línea hospedadora de partida. El uso de las estrategias de integración dirigida es de gran interés en muchas áreas, como las terapias génicas<sup>25-27</sup>, la epigenética<sup>28</sup> y la investigación de enfermedades<sup>29</sup>, siendo CRISPR/Cas9 una de las herramientas de mayor actualidad en el campo<sup>30-34</sup>. El uso de la técnica desarrollada en el presente trabajo permite el aislamiento de clones con características mejoradas, en comparación con otros protocolos tradicionales, en tan solo 3 semanas y la selección de una línea productora (tras el preceptivo cribado y caracterización de los clones) en 6 semanas. La alta efectividad en la integración dirigida (aprox. 20%) evita la necesidad de cribar un gran número de clones para encontrar el clon de interés. En futuros trabajos se pueden explorar varias posibilidades, como la confirmación del *hotpost* genómico mediante la integración directa de genes de interés en esa zona (sin mediar eGFP), la creación de otras líneas celulares hospedadoras alternativas con una mayor productividad o con otras características celulares deseables (crecimiento más rápido, mayor resistencia a las condiciones de estrés celular, etc...). Además, cabe optimizar mecanismo de integración dirigida para regular mejor la cantidad de genes transferidos, evitando las integraciones dobles que se producen en la mayoría (>50%) de los clones.

4. **La exploración, en biorreactores de laboratorio de 2 a 50 litros, de las características de crecimiento de una línea celular determinada es una parte indispensable en el proceso de desarrollo de una línea celular.** Los resultados obtenidos en el escalado hasta planta piloto de una línea celular productora de IFN $\gamma$  demuestran la importancia de evaluar separadamente cada etapa del escalado hasta la línea productiva, de acuerdo con sus propias características<sup>35-37</sup>. Las diferencias de crecimiento y producción encontradas entre el sistema de crecimiento en matraz y el biorreactor son críticas y puede llevar a la pérdida de toda o gran parte de las ventajas obtenidas en la definición genética de la línea celular productora. Los parámetros fisiológicos estudiados (pH y CO<sub>2</sub> disuelto), son parámetros clásicos ampliamente conocidos<sup>38,39</sup> y que, sin embargo, han necesitado una optimización en nuestro caso, y, potencialmente, la necesitaran en cualquier desarrollo de líneas celulares, junto con otros parámetros importantes del bioproceso, como el estrés mecánico debido a la agitación<sup>40</sup>, la agregación celular<sup>41</sup>, el nivel de oxígeno disuelto<sup>42</sup>, etc., parámetros todos ellos de máxima relevancia en la obtención de proteínas terapéuticas<sup>43</sup> de máxima calidad. Además, el proceso productivo implementado es sujeto de posteriores mejoras en la producción volumétrica a través de procesos más intensivos, como el batch fortificado, el fed-batch y la perfusión (Fig. 8.1), que deberán ser explorados en trabajos posteriores del grupo.

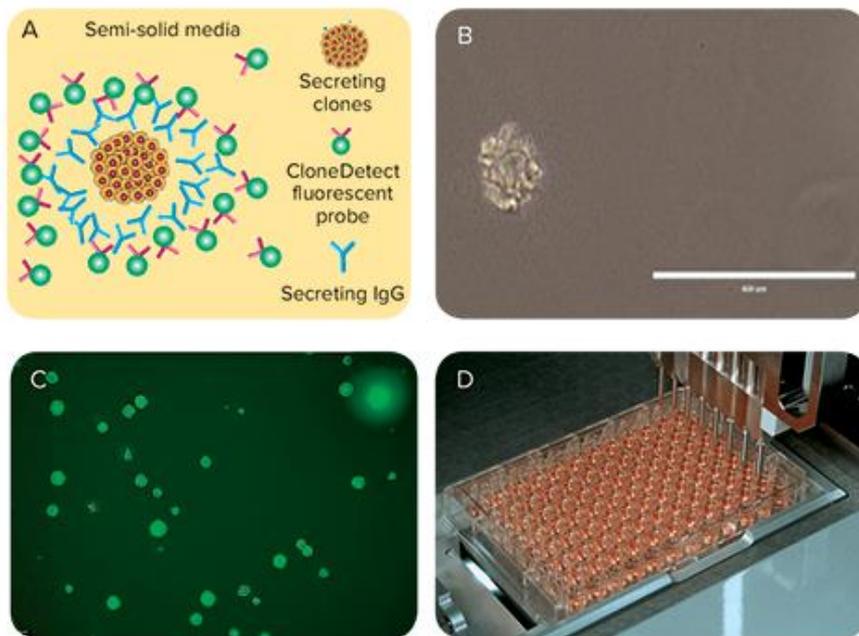
En términos relativos, se observa como la integración dirigida ha sido la técnica que ha permitido un aumento muy importante de la productividad específica de IFN $\gamma$ , mientras que en el caso del trastuzumab, la adopción del péptido señal del IFN $\alpha$ 2 ha sido la mejora que ha proporcionado un aumento mayor de productividad.



**Figura 8.1. Diferentes métodos de cultivo en biorreactor y su efecto sobre la densidad celular (Gráfico). Las flechas rojas indican entrada de medio de cultivo, mientras que las verdes indican salida y las azules, recirculación.**

Este hecho demuestra que la mejora de la productividad específica es un fenómeno altamente dependiente del producto a expresar, como está descrito en multitud de trabajos, y justifica plenamente todo el trabajo realizado, desde la adopción de 2 proteínas modelo para la validación de los resultados obtenidos tras los cribados con eGFP, hasta el uso de aproximaciones múltiples y la exploración de diversas técnicas para el aumento de la producción específica.

A pesar del éxito obtenido durante el presente trabajo a la hora de aumentar la producción específica de las biomoléculas problema y de implementar procesos productivos, los procesos y líneas celulares obtenidos aún son susceptibles de ulteriores mejoras. A parte de las oportunidades de mejora anteriormente reseñadas, la industria del sector biofarmacéutico utiliza toda una serie de tecnologías de última generación para la construcción de sus líneas productivas<sup>44</sup>, como ClonePix<sup>TM45</sup> (Fig.8.2), sistemas robóticos como Cello<sup>TM46</sup> o sistema completamente automatizado expofeso, como combinaciones del sistema Clone-select<sup>TM</sup> y el robot TECAN<sup>TM47</sup>.



**Figura 8.2: Principio de la tecnología ClonePix. A: Visión general del concepto de detección de anticuerpos a partir de clones individuales cultivados suspendidos en una matriz de metilcelulosa. B: imagen de la luz de un blanco de anticuerpos precipitados secuestrados alrededor de un clon de hibridoma en crecimiento. C: Detección y selección del sistema ClonePix de clones objetivo aceptables. D: Sistema ClonePix automatizado de selección y transferencia de clones objetivo aislados a las placas de destino. Extraído de <https://www.moleculardevices.com><sup>48</sup>, derechos reservados.**

El uso de estos sistemas, altamente costosos en términos económicos, permite el seguimiento y cribado masivo de miles de clones candidatos, así como el aislamiento de clones extremadamente productores. No obstante, cabe señalar que la aplicación de estas técnicas es compatible y complementaria con las desarrolladas en el presente trabajo, y que resultara siempre ventajoso, antes de proceder a cribados masivos, partir de las líneas celulares con la mayor productividad específica posible.

Por todo lo anteriormente reseñado, es posible concluir que se han conseguido abordar y completar con éxito los objetivos propuestos para el presente trabajo de tesis doctoral, generando y desarrollando herramientas y métodos de interés y con potenciales aplicaciones futuras en un sector de gran importancia económica e industrial, como es el de la producción de proteínas bioterapéuticas,

## 8.1 Referencias

1. Moritz, B., Becker, P. B. & Göpfert, U. CMV promoter mutants with a reduced propensity to productivity loss in CHO cells. *Sci. Rep.* **5**, 16952 (2015).
2. Ebadat, S. *et al.* Evaluating the efficiency of CHEF and CMV promoter with IRES and Furin/2A linker sequences for monoclonal antibody expression in CHO cells. *PLoS One* **12**, e0185967 (2017).
3. Wang, X. *et al.* The EF-1 $\alpha$  promoter maintains high-level transgene expression from episomal vectors in transfected CHO-K1 cells. *J. Cell. Mol. Med.* **21**, 3044–3054 (2017).
4. Ho, S. C. L., Mariati, Yeo, J. H. M., Fang, S. G. & Yang, Y. Impact of Using Different Promoters and Matrix Attachment Regions on Recombinant Protein Expression Level and Stability in Stably Transfected CHO Cells. *Mol. Biotechnol.* **57**, 138–144 (2015).
5. Wang, W. *et al.* Impact of different promoters, promoter mutation, and an enhancer on recombinant protein expression in CHO cells. *Sci. Rep.* **7**, 10416 (2017).
6. Haryadi, R. *et al.* Optimization of Heavy Chain and Light Chain Signal Peptides for High Level Expression of Therapeutic Antibodies in CHO Cells. *PLoS One* **10**, e0116878 (2015).
7. Liu, H. *et al.* Enhanced production of secretory glycoprotein VSTM1-v2 with mouse IgG $\kappa$  signal peptide in optimized HEK293F transient transfection. *J. Biosci. Bioeng.* **121**, 133–139 (2016).
8. Attallah, C., Etcheverrigaray, M., Kratje, R. & Oggero, M. A highly efficient modified human serum albumin signal peptide to secrete proteins in cells derived from different mammalian species. *Protein Expr. Purif.* **132**, 27–33 (2017).
9. Güler-Gane, G. *et al.* Overcoming the Refractory Expression of Secreted Recombinant Proteins in Mammalian Cells through Modification of the Signal Peptide and Adjacent Amino Acids. *PLoS One* **11**, e0155340 (2016).
10. Dalton, A. C. & Barton, W. A. Over-expression of secreted proteins from mammalian cell lines. *Protein Sci.* **23**, 517–525 (2014).
11. Huang, L.-F. *et al.* Efficient Secretion of Recombinant Proteins from Rice Suspension-Cultured Cells Modulated by the Choice of Signal Peptide. *PLoS One* **10**, e0140812 (2015).
12. Lee, J.-G., Takahama, S., Zhang, G., Tomarev, S. I. & Ye, Y. Unconventional secretion of misfolded proteins promotes adaptation to proteasome dysfunction in mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* **18**, 765–776 (2016).

13. Mariati, Koh, E. Y. C., Yeo, J. H. M., Ho, S. C. L. & Yang, Y. Toward stable gene expression in CHO cells. *Bioengineered* **5**, 340–5 (2014).
14. Chang, M., Liu, R., Jin, Q., Liu, Y. & Wang, X. Scaffold/matrix attachment regions from CHO cell chromosome enhanced the stable transfection efficiency and the expression of transgene in CHO cells. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **61**, 510–516 (2014).
15. Vaxelaire, E., Gamand, L., Aebischer-Gumy, C., Moretti, P. & Bertschinger, M. Use of a new genetic element to improve expression level of cell lines for recombinant protein production. *BMC Proc.* **9**, P4 (2015).
16. Rocha-Pizaña, M. del R., Ascencio-Favela, G., Soto-García, B. M., Martínez-Fierro, M. de la L. & Alvarez, M. M. Evaluation of changes in promoters, use of UCOES and chain order to improve the antibody production in CHO cells. *Protein Expr. Purif.* **132**, 108–115 (2017).
17. Benton, T. *et al.* The use of UCOE vectors in combination with a preadapted serum free, suspension cell line allows for rapid production of large quantities of protein. *Cytotechnology* **38**, 43–46 (2002).
18. Ramezani, A. & Ghaderi, A. Using a Dihydrofolate Reductase-Based Strategy for Producing the Biosimilar Version of Pertuzumab in CHO-S Cells. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.* **37**, 26–37 (2018).
19. Lee, J.-H. *et al.* Co-amplification of EBNA-1 and PyLT through dhfr-mediated gene amplification for improving foreign protein production in transient gene expression in CHO cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1–11 (2018). doi:10.1007/s00253-018-8977-6
20. Tang, D. *et al.* Supplementation of Nucleosides During Selection can Reduce Sequence Variant Levels in CHO Cells Using GS/MSX Selection System. *Biotechnol. J.* **13**, 1700335 (2018).
21. Barnes, L. M., Bentley, C. M. & Dickson, A. J. Characterization of the stability of recombinant protein production in the GS-NS0 expression system. *Biotechnol. Bioeng.* **73**, 261–270 (2001).
22. Yu, D. Y., Noh, S. M. & Lee, G. M. Limitations to the development of recombinant human embryonic kidney 293E cells using glutamine synthetase-mediated gene amplification: Methionine sulfoximine resistance. *J. Biotechnol.* **231**, 136–140 (2016).
23. Kuwae, S., Miyakawa, I. & Doi, T. Development of a chemically defined platform fed-batch culture media for monoclonal antibody-producing CHO cell lines with optimized choline content. *Cytotechnology* 1–10 (2018). doi:10.1007/s10616-017-0185-1
24. Xu, J. *et al.* Improving titer while maintaining quality of final formulated drug substance via optimization of CHO cell culture conditions in low-iron chemically defined media. *MAbs* **10**, 488–499 (2018).

25. Phelps, M., Yang, H. & Chen, E. Abstract 5096: Targeted ablation of essential oncogenes in rhabdomyosarcoma with CRISPR/Cas9 gene therapy. *Cancer Res.* **77**, 5096–5096 (2017).
26. Gerace, D. *et al.* CRISPR-targeted genome editing of mesenchymal stem cell-derived therapies for type 1 diabetes: a path to clinical success? *Stem Cell Res. Ther.* **8**, 62 (2017).
27. Paul, B. *et al.* Efficient enrichment of gene-modified primary T-cells via CCR5-targeted integration of mutant dihydrofolate reductase. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* (2018). doi:10.1016/J.OMTM.2018.04.002
28. Liao, H.-K. *et al.* In Vivo Target Gene Activation via CRISPR/Cas9-Mediated Trans-epigenetic Modulation. *Cell* **171**, 1495–1507.e15 (2017).
29. Kesavan, G., Chekuru, A., Machate, A. & Brand, M. CRISPR/Cas9-Mediated Zebrafish Knock-in as a Novel Strategy to Study Midbrain-Hindbrain Boundary Development. *Front. Neuroanat.* **11**, 52 (2017).
30. Akcakaya, P. *et al.* In vivo CRISPR-Cas gene editing with no detectable genome-wide off-target mutations. *bioRxiv* 272724 (2018). doi:10.1101/272724
31. Watakabe, I. *et al.* Highly efficient generation of knock-in transgenic medaka by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Zool. Lett.* **4**, 3 (2018).
32. Bak, R. O., Dever, D. P. & Porteus, M. H. CRISPR/Cas9 genome editing in human hematopoietic stem cells. *Nat. Protoc.* **13**, 358–376 (2018).
33. Yao, X. *et al.* CRISPR/Cas9-mediated Targeted Integration In Vivo Using a Homology-mediated End Joining-based Strategy. *J. Vis. Exp.* (2018). doi:10.3791/56844
34. Brunetti, L., Gundry, M. C., Kitano, A., Nakada, D. & Goodell, M. A. Highly Efficient Gene Disruption of Murine and Human Hematopoietic Progenitor Cells by CRISPR/Cas9 Video Link. *J. Vis. Exp* **57278**, (2018).
35. Rajendra, Y. *et al.* Bioreactor scale up and protein product quality characterization of piggyBac transposon derived CHO pools. *Biotechnol. Prog.* **33**, 534–540 (2017).
36. Xing, Z., Kenty, B. M., Li, Z. J. & Lee, S. S. Scale-up analysis for a CHO cell culture process in large-scale bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* **103**, 733–746 (2009).
37. Marques, M. P. C., Cabral, J. M. S. & Fernandes, P. Bioprocess scale-up: quest for the parameters to be used as criterion to move from microreactors to lab-scale. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **85**, 1184–1198 (2010).
38. Zhu, M. M. *et al.* Effects of Elevated pCO<sub>2</sub> and Osmolality on Growth of CHO Cells and Production of Antibody-Fusion Protein B1: A Case

- Study. *Biotechnol. Prog.* **21**, 70–77 (2008).
39. Brunner, M. *et al.* The impact of pH inhomogeneities on CHO cell physiology and fed-batch process performance - two-compartment scale-down modelling and intracellular pH excursion. *Biotechnol. J.* **12**, 1600633 (2017).
  40. Senger, R. S. & Karim, M. N. Effect of Shear Stress on Intrinsic CHO Culture State and Glycosylation of Recombinant Tissue-Type Plasminogen Activator Protein. *Biotechnol. Prog.* **19**, 1199–1209 (2008).
  41. Liu, H. *et al.* A high-yield and scaleable adenovirus vector production process based on high density perfusion culture of HEK 293 cells as suspended aggregates. *J. Biosci. Bioeng.* **107**, 524–529 (2009).
  42. Restelli, V. *et al.* The effect of dissolved oxygen on the production and the glycosylation profile of recombinant human erythropoietin produced from CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.* **94**, 481–494 (2006).
  43. Brunner, M., Fricke, J., Kroll, P. & Herwig, C. Investigation of the interactions of critical scale-up parameters (pH, pO<sub>2</sub> and pCO<sub>2</sub>) on CHO batch performance and critical quality attributes. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **40**, 251–263 (2017).
  44. Priola, J. J. *et al.* High-throughput screening and selection of mammalian cells for enhanced protein production. *Biotechnol. J.* **11**, 853–865 (2016).
  45. Hou, J. J. C. *et al.* High-throughput ClonePix FL analysis of mAb-expressing clones using the UCOE expression system. *N. Biotechnol.* **31**, 214–220 (2014).
  46. Salmén, A. *et al.* in *Proceedings of the 21st Annual Meeting of the European Society for Animal Cell Technology (ESACT), Dublin, Ireland, June 7-10, 2009* 507–510 (Springer Netherlands, 2012). doi:10.1007/978-94-007-0884-6\_86
  47. Shi, S. *et al.* A High-throughput Automated Platform for the Development of Manufacturing Cell Lines for Protein Therapeutics. *J. Vis. Exp.* (2011). doi:10.3791/3010
  48. Molecular Devices | Life Science Applications | Bioanalytical Measurement Solutions. Available at: <https://www.moleculardevices.com/>. (Accedido: 25 de abril de 2018)

# CAPITULO 9

## 9. MATERIALES Y METODOS

### 9.1 Material biológico

#### 9.1.1 Líneas celulares

##### 9.1.1.1 Línea celular original HEK293SF-3F6

En este trabajo se ha empleado la línea celular HEK293SF-3F6, derivada de la línea parental HEK293, que proviene de células riñón de embrión humano inmortalizadas mediante transfección de adenovirus. La línea HEK293SF-3F6 es una variante adaptada al cultivo en suspensión (La línea original HEK293 es de crecimiento adherente) en medio de cultivo sin suero bovino. (SFM, *Serum-free medium*) y ha sido cedida por el Dr. A. Kamen, del NRCC (*National Research Council of Canada*)

##### 9.1.1.2 Líneas celulares derivadas

A partir de la línea celular original, se han generado diferentes líneas celulares monoclonales derivadas para diversos experimentos en los que eran necesarias características que no poseía la línea original. A continuación, se listan las que han sido más relevantes para la realización del presente trabajo

- Líneas celulares auxotróficas:
  - HEK-2C10: Auxótrofa para la timidina. Generada mediante *knock-out* del gen *TYMS* usando CRISPR/Cas9.
  - HEK-4C3: Auxótrofa para la glutamina. Generada mediante *knock-out* del gen *GLUL* usando CRISPR/Cas9.
- Líneas celulares hospedadoras para integración dirigida usando CRISPR/cas9:
  - HEK-N1D8: Resistente a G418, expresión de eGFP a partir de una localización genómica única y conocida (6q23.5)
- Líneas celulares productoras creadas a partir de la línea HEK-N1D8

- HEK/N-T103F7: Línea productora de Trastuzumab con péptido señal de IFN $\alpha$ 2 con productividad específica mejorada.
- HEK/N-I2D7: Línea productora de IFN $\gamma$  con productividad específica mejorada.

### 9.1.2 Cepas bacterianas

Se ha usado la cepa *E.coli* DH5 $\alpha$  como receptora para la obtención y amplificación de los plásmidos construidos en este trabajo. Su genotipo es: F- $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK $^-$ , mK $^+$ ) *phoA supE44*  $\lambda^-$  *thi-1 gyrA96 relA1*

## 9.2 Medios de cultivo

### 9.2.1 Medio de cultivo para la línea celular HEK293

#### 9.2.1.1 Medio de cultivo base

El medio base que se ha utilizado para el cultivo de línea celular HEK293 es el medio comercial SFM4Transfex (SH3086002, Hyclone). Este medio de cultivo es un medio libre de suero bovino, cuya composición no está publicada. Los análisis efectuados han determinado que contiene una concentración de glucosa de 4g/L. Este medio se ha de suplementar en función de la línea celular a cultivar, como se detalla en los siguientes apartados.

#### 9.2.1.2 Medio para la selección y cultivo de células resistentes a antibióticos

Sobre 900mL de medio de cultivo SFM4Transfex estéril, añadir, en cabina de flujo (Telstar AV-100):

- 20mL de solución de GlutaMAX estéril (35050061, Gibco)
- 100mL de una solución de CellBoost 5 (SH30865, Hyclone) al 60% (p/v), filtrada estérilmente mediante filtro Sterivex de 0,22 $\mu$ m (10411741, Millipore)
- 2mL de una solución estéril de puromicina (P8833, Sigma) al 0,1% (p/v) para la selección de células resistentes a puromicina o 20mL de solución comercial de G418 (G418-RO, Sigma)

La concentración final de puromicina es de 2mg/L. Durante el trabajo de tesis se ha usado también la variante con 50mg/L de puromicina para el cultivo de las células productoras de Trastuzumab. La concentración final de G418 en el medio es de 1g/L.

#### *9.2.1.3 Medio para la selección y cultivo de células auxotróficas para la timidina*

Sobre 900mL de medio de cultivo SFM4Transfex estéril, añadir, en cabina de flujo (Telstar AV-100):

- 20mL de GlutaMAX estéril (35050061, Gibco)
- 100mL de una solución de CellBoost 5 (SH30865, Hyclone) al 60% (p/v), filtrada estérilmente mediante filtro Sterivex de 0,22µm (10411741, Millipore)
- 1mL de solución de timidina (T9250, Sigma) 16mM, filtrada estérilmente mediante filtro Sterivex de 0,22µm (10411741, Millipore)

#### *9.2.1.4 Medio para la selección y cultivo de células auxotróficas para la glutamina*

Sobre 900mL de medio de cultivo SFM4Transfex estéril, añadir, en cabina de flujo (Telstar AV-100):

- 60mL de solución GSEM estéril (G9785, Sigma)
- 100mL de una solución de CellBoost 5 (SH30865, Hyclone) al 60% (p/v), filtrada estérilmente mediante filtro Sterivex de 0,22µm (10411741, Millipore)

#### *9.2.1.5 Medio para la selección y cultivo de células auxotróficas para la tirosina*

Para el uso del sistema de selección mediante Fenilalanina hidroxilasa (PAH), se usa una variante del medio clásico DMEM, eliminando la tirosina de la formulación. Además, el medio se suplementa con suero fetal bovino (FBS, *Fetal bovine serum*, F4135, Sigma). La preparación se realiza a partir de la pesada de los siguientes componentes (Tabla 9.1) por cada litro de medio:

**Tabla 6: Componentes individuales del medio DMEM modificado para la selección de células mediante el sistema PAH.**

Componente	g/L
<b>Sales inorgánicas</b>	
CaCl <sub>2</sub>	0,2
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9 H <sub>2</sub> O	0,0001
MgSO <sub>4</sub>	0,09767
KCl	0,4
NaHCO <sub>3</sub>	3,8
NaCl	6,4
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,109
<b>Aminoácidos</b>	
L-Arginina • HCl	0,084
L-Cistina • 2HCl	0,0626
Glicina	0,03
L-Histidina • HCl • H <sub>2</sub> O	0,042
L-Isoleucina	0,105
L-Leucina	0,105
L-Lisina • HCl	0,146
L-Metionina	0,03
L-Fenilalanina	0,066
L-Serina	0,042
L-Treonina	0,095
L-Triptófano	0,016
L-Valina	0,094
<b>Vitaminas</b>	
Cloruro de colina	0,004
Ácido fólico	0,004
<i>myo</i> -Inositol	0,0072
Niacinamida	0,004
Acido Pantoténico	0,004
Piridoxal • HCl	0,004
Riboflavina	0,0004
Tiamina • HCl	0,004
<b>Otros</b>	
D-Glucosa	4
Rojo de Fenol • Na	0,0159

Los componentes pesados se disuelven en 900mL de H<sub>2</sub>O ultrapura (Obtenida en un aparato de ultrafiltración Milli-Q Plus, Millipore) mediante el uso de un agitador magnético. La disolución tarda unos 10 minutos, durante los cuales se ha de burbujear CO<sub>2</sub> al medio de cultivo hasta el punto de saturación (Conocido por el viraje al amarillo del indicador rojo de fenol). Una vez disueltos los componentes, el medio se filtra mediante filtro Sterivex de 0,22µm (10411741, Millipore) en cabina de flujo laminar. Posteriormente, se suplementa con 100mL de FBS dializado (DFBS).

La preparación del DFBS para la eliminación de los aminoácidos contenidos en el mismo se realiza mediante diálisis usando un equipo de ultrafiltración tangencial Pellicon (Millipore) equipado con cassette Biomax 10 (Millipore) de 10Kd de corte molecular. En cada lote de DFBS se han dializado 100mL de FBS a volumen constante contra 500mL de tampón fosfato (DPBS, Hyclone) (5 recambios totales).

Para el medio que han usado los controles en los experimentos de selección con PAH, se ha tomado una alícuota del medio preparado como se describe anteriormente y se ha suplementado con 2mg/L de puromicina y 0.10379g/L de L-tirosina (T2269, Sigma)

## 9.2.2- Medio de cultivo para la cepa bacteriana

### 9.2.2.1- Medio LB líquido

Pesar en una botella los siguientes componentes:

**Tabla 7: Componentes del medio LB líquido por litro de medio**

Componente	g/L
Triptona (Oxoid)	10
Extracto de levadura (Oxoid)	5
NaCl (Panreac)	5

Disolver en 1L de H<sub>2</sub>O ultrapura y ajustar el pH entre 7.0 y 7.5 con una solución de NaOH al 30%. El medio se esteriliza en autoclave, 121°C durante 20 minutos.

### 9.2.2.2- Medio LB sólido

Pesar en una botella los siguientes componentes:

**Tabla 3: Componentes del medio LB sólido por litro de medio**

Componente	g/L
Triptona (Oxoid)	10
Extracto de levadura (Oxoid)	5
NaCl (Panreac)	5
Agar (Oxoid)	<b>12</b>

Disolver en 1L de H<sub>2</sub>O ultrapura y ajustar el pH entre 7.0 y 7.5 con una solución de NaOH al 30%. El medio se esteriliza en autoclave, 121°C durante 20 minutos. El medio se atempera en un baño de agua a 50°C, se disponen 15 ml de medio en placas de Petri estériles (Sterilin) y se deja solidificar. Estas se conservan en 4°C.

#### 9.2.2.3- Medio selectivo

Todos los vectores usados en el trabajo disponen de una parte bacteriana para la propagación de los mismos en *E.coli*. En todos los casos, contienen un gen de resistencia a ampicilina, con lo cual, es necesario suplementar los medios de cultivo anteriormente descritos con 500µg/mL de ampicilina (A0166, Sigma). Se suplementan mediante la adición de 1mL/L de una solución de ampicilina 10% (p/v) filtrada a 0,22µm con filtro de jeringa (Millex, Millipore). En el caso del medio de cultivo sólido, es necesario esperar hasta que se atempera a 50°C antes de añadir el antibiótico, dado el peligro de inactivación térmica del mismo.

### 9.3 Mantenimiento y comprobación del material biológico

#### 9.3.1 Mantenimiento de las líneas celulares HEK293

Las líneas celulares HEK293 se conservan en criotubos (Nunc, 377267) congelados en un contenedor de nitrógeno líquido (Forma Scientific, CMR 8031, Cryomed) a una temperatura de -196°C. Antes de realizar los experimentos, se descongela uno de los criotubos y se inicia un cultivo. El proceso de descongelación debe ser rápido para asegurar una recuperación óptima de la célula y se realiza según la metodología descrita por Sambrook et al<sup>1</sup>, .Si se desea preservar alguna de las sublíneas obtenidas durante el trabajo se procede a su

congelación siguiendo el protocolo estándar con DMSO descrito por el mismo autor.

Una vez se dispone de la línea celular descongelada, las células se cultivan a 37°C en una atmósfera al 90% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>, en *T-flasks* (Ver apartado 9.4, Sistemas de cultivo) de 25 cm<sup>2</sup> durante un periodo no superior de tres meses. Los cultivos se resiembran cada 2 o 3 días, que es cuando las células se encuentran en plena fase de crecimiento exponencial, con un inóculo de 2\*10<sup>5</sup> células viables/ml en 10 ml del medio de cultivo correspondiente. Estos cultivos permiten disponer siempre de un stock de células a partir del cual se pueden hacer crecer los inóculos para llevar a cabo los diferentes experimentos. Previamente a la realización de los experimentos, se realiza una breve adaptación al cultivo en suspensión (Ya que la línea original ya está adaptada), cultivando las células durante 1 semana en matraces agitados (*Shake flasks*) de 100mL, en iguales condiciones de incubación, con una agitación orbital de 110rpm.

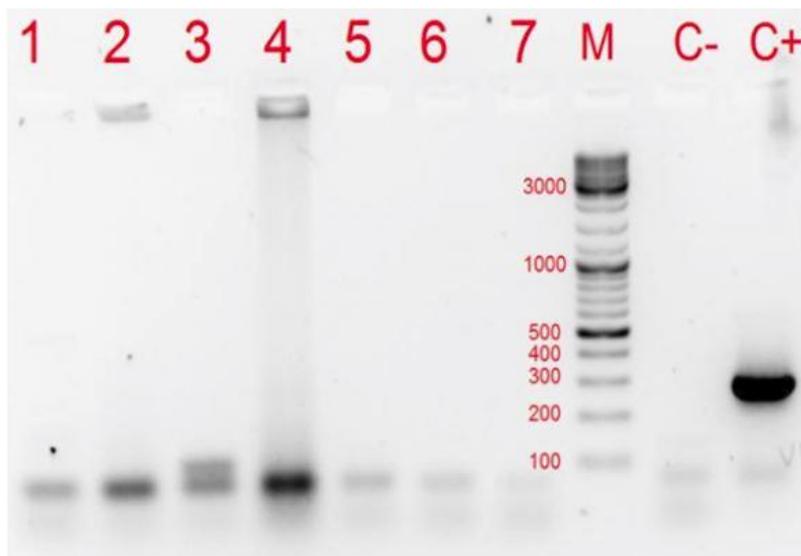
El mantenimiento de la esterilidad en todos estos procesos es extremadamente importante. Por este motivo, es necesario comprobar regularmente la ausencia de contaminaciones, manteniendo alícuotas de medio sin células en el incubador y comprobando al microscopio la ausencia de bacterias, levaduras u hongos.

Todas las manipulaciones celulares, así como la preparación de todas las soluciones estériles se llevaron a cabo en una cámara de flujo laminar vertical (Telstar, AV-100).

### **9.3.2 Comprobación de contaminación por *Mycoplasma spp.* en las líneas celulares HEK293.**

*Mycoplasma spp.* es una bacteria parásita de las células de animales vertebrados. Las micoplasmas pueden inducir cambios celulares, como cambios en el metabolismo y el crecimiento celular, e infecciones graves que pueden destruir una línea celular e invalidar los experimentos realizados, por lo que resulta crítico comprobar la ausencia de este parásito en las líneas celulares utilizadas en los estudios<sup>2</sup>. La comprobación se ha realizado mediante reacción en cadena de la polimerasa, como se describe en el apartado 9.8.6, mediante el uso de un kit

comercial validado a tal efecto (EZ-PCR Mycoplasma Test kit, 20-700-20, BI). Todas las líneas originales y construidas durante el presente trabajo estaban libres de *Mycoplasma* (Fig.9.1)



**Figura 9.1:** Gel de agarosa mostrando los resultados del test de Mycoplasma sobre diferentes líneas celulares: HEK293SF-3F6 (1: Cell bank, 2: Final proceso), HEK293\_2C10 (3), HEK293\_4C3(4), HEK293\_N1D8 (5), HEK/N-T103F7 (6), HEK/N-I2D7 (7). El resultado positivo implica la amplificación de una banda de 280pb (C+)

### 9.3.3 Mantenimiento de la cepa bacteriana

Para la conservación de cepas se preparan cultivos stock glicerinados con 1.5 ml de cultivo en fase exponencial y glicerol al 30% (p/v). Los glicerinados se mantienen a - 80°C (congelador Nuaire, UN-6512E).

## 9.4 Sistemas de cultivo

### 9.4.1 Sistemas de cultivo para células animales

#### 9.4.1.1 Placas de cultivo de 6, 12 y 96 pozos.

Las placas de cultivo son placas de poliestireno (Orange Científico, 2030400) que permiten cultivar hasta un volumen máximo 200µL medio por pozo en el caso de las placas de 96 pozos (Usadas exclusivamente para el aislamiento clonal

mediante *cell-sorting*), de 1 ml de medio por pozo en las placas de 12 pozos y un volumen máximo de 2 ml de medio por pozo en las placas de 6 pozos.

Estas placas se han utilizado para llevar a cabo las transfecciones de las líneas celulares y para el control regular de la esterilidad de los medios de cultivo y de los diferentes stocks de las soluciones empleadas para suplementar los medios.

#### 9.4.1.2 *T-flasks*

Los *T-flasks* son frascos de poliestireno que se suministran estériles y que se usan para el cultivo estático de las células. Las medidas utilizadas son de 25 cm<sup>2</sup> (Nunc T-flask 136196) para cultivos de volumen de 10 ml y de 260 cm<sup>2</sup> (Nunc T-flask 178.891) para cultivos de volumen de 40 ml de medio. En el tapón del cultivo hay presente un filtro de 0,22µm de diámetro de poro que facilita el intercambio de gases con el exterior, permite el control del pH y mantiene las condiciones de esterilidad.

El cultivo se lleva a cabo dentro de un incubador (Forma Scientific, Incubador IR con filtro HEPA, modelo 3862) a 37°C, en una atmósfera saturada de humedad (95%) para evitar la evaporación del medio, y un 5% de CO<sub>2</sub> para controlar el pH en medios con tampón bicarbonato.

#### 9.4.1.3- *Matraces agitados o Shake Flask*

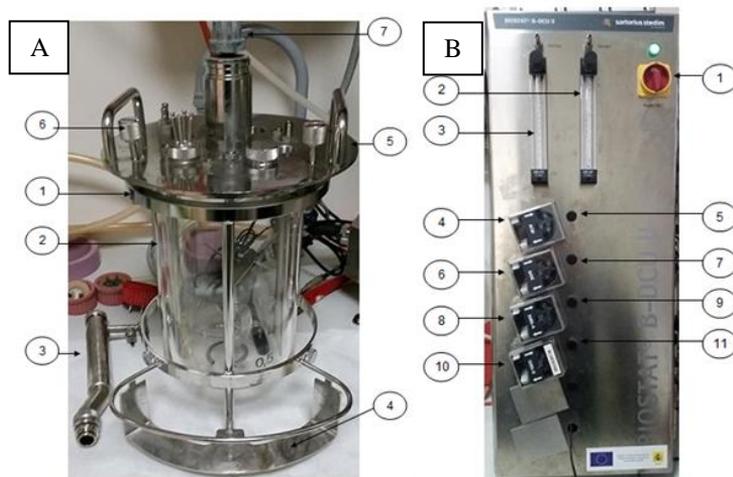
Los *shake flasks* son matraces agitados de poliestireno de un solo uso, que se suministran estériles, disponen de un tampón de venteo con filtro de 0,22µm. Se usan para el cultivo de células en suspensión, de manera análoga a los matraces Erlenmeyer usados en cultivo bacteriano. Al estar agitados, permiten una mejor transferencia del oxígeno del aire, consiguiéndose de esta forma cultivos de mayor densidad celular que los sistemas estáticos.

De manera rutinaria, los cultivos en *shake flask* se inoculan a una densidad inicial  $2 \times 10^5$  cell viables/mL y se incuban a 37°C, 95% de Humedad, 5% de CO<sub>2</sub> y 110rpm de agitación orbital.

En el trabajo de tesis se han usado *shake flasks* de 100mL con 20mL de medio de cultivo para las resiembras y experimentos, y de 1L con 200mL de medio para realizar escalados para inocular los experimentos en biorreactor.

#### 9.4.1.4 Cultivo en biorreactor de laboratorio en batch

El biorreactor de laboratorio es un equipo destinado al cultivo de microorganismos y células animales en condiciones controladas de T<sup>a</sup>, pH y Concentración de oxígeno disuelto. Consta de una cuba de cultivo (Fig.9.2A), donde se realiza el mismo en condiciones controladas y estériles y de una unidad de control digital (Fig.9.2B), que recoge la información de las sondas y actúa sobre el cultivo para mantener los parámetros establecidos por el usuario.



**Figura 9.2: Partes de la cuba (A) (1. Cubra de cristal, 2. Soporte metálico para la cuba 3. Condensador, 4. Soporte para reactivos de adición al biorreactor, 5. Tapa con puertos para entradas y salidas, 6. Tornillos para fijar la tapa a la cuba, 7. Soporte para el motor del agitador. Partes de la DCU (B): 1. Botón de encendido/apagado de la Supply Tower, 2. Rotámetro para los gases de salida hacia Sparger, 3. Rotámetro para los gases de salida hacia Overlay, 4. Bomba para adición de ácido, 5. Botón on/off manual de la bomba de adición de ácido, 6. Boma para adición de base, 7. Botón on/off manual de la bomba de adición de base, 8. Bomba para adición de sustrato SUBS-A, 9. Botón on/off manual de la bomba de adición de sustrato SUBS-A, 10. Bomba para adición de sustrato SUBS-B ,11. Botón on/off manual de la bomba de adición de sustrato SUBS-B**

Durante el presente trabajo se ha usado el biorreactor Biostat B-DCU-II (Sartorius), equipado con una cuba de 2L de volumen de trabajo, siguiendo el procedimiento que se describe:

1. Esterilizar la cuba previamente mediante autoclave a 121°C, 30 minutos, con 2L de PBS y preparado para el cultivo (Filtros, conducciones, botellas de adición de Acido y base)

2. Una vez estéril y a  $T^a$  de trabajo, comprobar que no haya ninguna entrada de gases y cerrar todas las conexiones excepto la botella estéril de entrada/salida al reactor y la del *Sparger*, comprobando que su filtro de gases esté en buen estado.
3. Introducir aire por *Sparger* para impulsar el PBS del biorreactor hacia la botella estéril vacía por sobrepresión. Tener cuidado con la sobrepresión y el burbujeo, utilizando un caudal bajo cuando quede poco PBS (0,1-0,2 lpm) y parar la entrada de aire cuando empiece a burbujear dentro de la botella.
4. Entrar la botella estéril con el PBS en la cabina de flujo laminar y cambiarla por la botella que contenga el medio de cultivo. Sacar la botella de la cabina.
5. Comprobar que no haya ninguna entrada de gases y cerrar todas las conexiones excepto la de la botella con el medio y la salida de gases hacia el condensador.
6. Introducir aire por el filtro de la botella con el medio para impulsarlo hacia el reactor por sobrepresión. Tener cuidado con la sobrepresión acumulada, utilizando un caudal bajo de aire cuando quede poco medio en la botella y parar la entrada de aire cuando empiece a burbujear dentro del reactor. Cerrar la conexión entre botella y reactor.
7. Cuando el medio esté en el reactor, se pueden activar los valores de consigna para el cultivo, o la receta mediante el software MFCSwin (Registro informático de los datos del proceso).
8. Es necesario dejar el medio en el reactor con los valores de consigna un mínimo de 12 horas para comprobar su esterilidad antes de la inoculación.
9. Previamente a introducir el inóculo en el reactor, comprobar que se han estabilizado las variables controladas en los valores de consigna de pH, temperatura, pO<sub>2</sub> y agitación en el medio de cultivo, y que este no esté contaminado.
10. Dentro de la cabina de flujo laminar, abrir a botella estéril con la que se introdujo el medio de cultivo i trasvasar el volumen de inóculo necesario

desde el *Shake* de escalado hasta la botella que conecta con el reactor.  
Usar la siguiente expresión para el cálculo:

Donde:

$$V_i = \frac{V_{r,t} * C_{r,0}}{C_i}$$

$V_i$ : volumen de inóculo a introducir en el reactor en mL  
 $V_{r,t}$ : volumen total del reactor, sumando el volumen de medio introducido previamente y el del inóculo.  
 $C_i$ : concentración del inóculo ( $\times 10^5$  células/mL)  
 $C_{r,0}$ : concentración inicial deseada en el reactor ( $\times 10^5$  células/mL)

11. Sacar de la cabina la botella.
12. Con la ayuda de una bomba peristáltica, impulsar el inóculo desde la botella hasta el reactor (si la bomba no tiene suficiente fuerza para impulsar el inóculo, ver punto 5).
13. Comprobar que no quede ninguna entrada ni salida de gases y cerrar todas las conexiones excepto la que conecta la botella con el inóculo y el reactor. Tampoco cerrar el tubo de salida del condensador. Sin dejar de usar la bomba peristáltica, introducir un caudal bajo (e.g. 0,1 lpm) de aire a presión por el filtro de gases de la botella que contiene el inóculo para ayudar a impulsarlo hacia el reactor por sobrepresión. Tener mucho cuidado con el burbujeo, ya que puede comprometer el estado de las células. Parar el caudal de aire y sacar el tubo de la bomba. Cerrar la conexión entre la botella ya vacía y el reactor.
14. A partir de este momento, se desarrolla el cultivo, según los parámetros definidos en la DCU. Los procesos en Batch realizados en este trabajo tienen una duración aproximada de 1 semana. Se ha de muestrear diariamente, determinando concentración y viabilidad celular, niveles de glucosa y lactato y nivel de producción de la molécula de interés, si aplica.

#### 9.4.1.5 Cultivo en biorreactor piloto

El biorreactor a escala piloto es un sistema que permite cultivar en escala piloto (desde 12L hasta 50L) consiguiendo un proceso que sea reproducible desde el cultivo a escala de laboratorio hasta la etapa de producción a gran escala.

Durante el trabajo de tesis se ha usado un biorreactor Biostat STR50 (Sartorius), caracterizado por el uso de la tecnología de un solo uso (*Single-Use*). En este biorreactor, la cuba de proceso es sustituida por una bolsa plástica estéril que se utiliza para un solo proceso, minimizando las posibilidades de contaminación por parte de microorganismos termorresistentes, y eliminando las contaminaciones e interferencias debidas al cruce de diferentes productos y líneas celulares (*Crossover*), que requieren de costosos procesos de limpieza y validación en las plantas piloto convencionales de acero inoxidable.



**Figura 9.3: Partes del biorreactor STR50 SU: 1. Pantalla de la unidad digital de control (DCU), 2.Soporte para bolsa de cultivo (*Bag Holder*), 3.Brazo del motor, 4.Motor del agitador,5.Soporte para filtros, 6.Camisa de calefacción 7.Tubos de entrada/salida de agua a la camisa de calefacción, 8.Bombas de la DCU, 9.Rotámetros para caudal de gases, 10. Manivela para fijar la posición del soporte, 11. Brazo para ajustar la posición del soporte**

Las diferentes partes del biorreactor se pueden observar en la figura 9.3. Al igual que el biorreactor de laboratorio, consta de una unidad de proceso digital (DCU) y de una estructura de soporte donde se introduce la bolsa, que dispone de sondas de un solo uso para pH y pO<sub>2</sub>, además de un agitador plástico para la homogeneización del cultivo.

Los cultivos se han realizado según el siguiente protocolo:

1. Desembalar la bolsa estéril de cultivo siguiendo las instrucciones del fabricante y montarla en el *bag holder*.
2. Realizar las conexiones de la conducción de gases.
3. Preparar el medio de cultivo en un recipiente limpio, preferiblemente, una bolsa de preparación de medio estéril. Una vez disuelto el medio, introducirlo en la bolsa del biorreactor mediante un filtro esterilizante de 0,22mm (Sartopore 2, Sartorius). Usar una bomba peristáltica para impulsar el medio, no aire comprimido, ya que la bolsa no tiene garantía de esterilidad si es sometida a una presión superior a 0,25bar.
4. Introducir las sondas de fibra óptica de pH y pO<sub>2</sub> en los puertos correspondientes. Introducir los valores de calibrado (En una pegatina sobre la bolsa) en la DCU.
5. Cuando el medio esté en el reactor, se pueden activar los valores de consigna para el cultivo, o la receta mediante el software MFCSwin (Registro informático de los datos del proceso).
6. Es necesario dejar el medio en el reactor con los valores de consigna un mínimo de 12 horas para comprobar su esterilidad antes de la inoculación.
7. Previamente a introducir el inóculo en el reactor, comprobar que se han estabilizado las variables controladas en los valores de consigna de pH, temperatura, pO<sub>2</sub> y agitación en el medio de cultivo, y que este no esté contaminado.
8. Unir el biorreactor de inoculación (Biorreactor de 2L) a la bolsa mediante conexión estéril usando el puerto preparado a tal efecto en la bolsa STR. (Operación en cabina de flujo).

9. Presurizar ligeramente el reactor de inóculo con aire para impulsar el inóculo hasta la bolsa STR. Inocular la cantidad necesaria para una densidad inicial de  $0,2 \cdot 10^6$  cell/mL (Calcular como en paso 10 del apartado 9.4.1.4)
10. Comprobar que no quede ninguna entrada ni salida de gases y cerrar todas las conexiones excepto la que conecta la botella con el inóculo y el reactor.
11. A partir de este momento, se desarrolla el cultivo, según los parámetros definidos en la DCU. Los procesos en Batch realizados en este trabajo tienen una duración aproximada de 1 semana. Se ha de muestrear diariamente, determinando concentración y viabilidad celular, niveles de glucosa y lactato y nivel de producción de la molécula de interés, si aplica.

#### **9.4.2 Sistemas de cultivo de la cepa bacteriana**

Los cultivos de *E.coli* se han realizado en matraces Erlenmeyer de diferentes volúmenes (25, 50 y 250 ml), a 37°C y 130rpm de agitación orbital y también en placas de Petri con 20 ml de medio sólido para el aislamiento de colonias individuales.

### **9.5 Análisis de los cultivos celulares**

#### **9.5.1 Determinación del recuento y la viabilidad celular**

##### *9.5.1.1 Recuento manual mediante observación microscópica.*

El recuento se realiza a partir de la toma de una alícuota de la suspensión celular de manera estéril.

El número de células vivas, muertas, totales y el porcentaje de viabilidad que presenta el cultivo se calculan a partir del conteo a 100 aumentos mediante un microscopio invertido de contraste de fase (Nikon, TMS) en un hemocitómetro del tipo cámara de Neubauer (Neubauer Improved, Brand). El hemocitómetro es un portaobjetos con cuatro campos o cavidades cuadradas donde hay dibujadas unos cuadrantes de 4x4 cuadrados microscópicos. En cada campo cabe un

volumen de muestra conocido, y los dieciséis cuadros dibujados facilitan el recuento de las células presentes en cada campo.

Para diferenciar las células vivas de las muertas, se tiñe la alícuota a recotar en proporción 1:1 con una solución de azul tripán (Sigma, T8154) diluida al 0.2% (v/v) en PBS 0.1 M, pH: 7. El colorante sólo penetra en el interior de las células muertas y les da un color azulado. Por el contrario, las células vivas se diferencian perfectamente de las muertas por su color blanco brillante. Una gota de la dilución se deposita en la zona de recuento del hemocitómetro y se cubre con un cubreobjetos (Menzel-Gaser). A continuación, se realiza el recuento de células vivas y muertas en cada uno de los cuatro campos. Los valores superior e inferior obtenidos se rechazan, mientras que los otros dos se promedian.

El cálculo de la concentración de células presente en el cultivo se realiza mediante la siguiente expresión:

$$\text{Concentración celular (células/mL)} = \frac{n_1 + n_2}{d * V_{\text{campo}}}$$

donde  $n_1$  y  $n_2$  son el número de células contadas en ambos campos seleccionados,  $m$  es el número de campos contados y tiene un valor de 2,  $d$  es la dilución con azul tripán realizada, igual a 0,5 y  $V_{\text{campo}}$  es el volumen de muestra presente en cada campo que tiene un valor de  $10^{-4}$  ml. De esta manera la expresión queda reducida:

$$\text{Concentración celular (células/mL)} = (n_1 + n_2) * 10^4$$

Esta expresión es aplicable a las células viables y muertas.

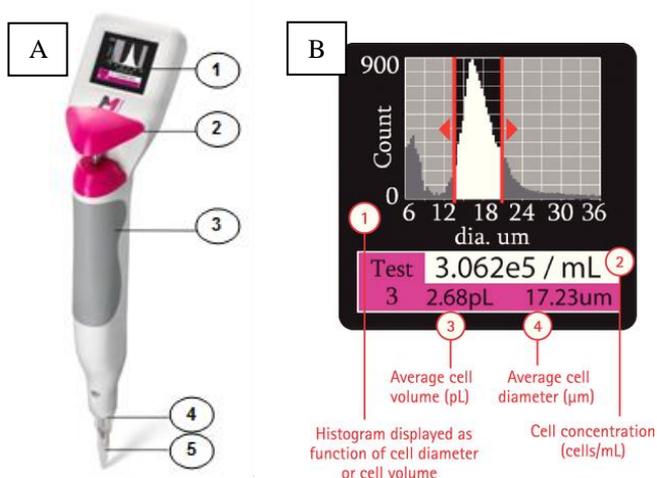
Para obtener el porcentaje de viabilidad es necesario, por tanto, calcular previamente el número total de células (suma de las viables y las muertas) y, posteriormente, aplicar la siguiente expresión:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{[\text{Células viables}]}{[\text{Células totales}]} * 100$$

### 9.5.1.2 Recuento automatizado

El recuento se realiza a partir de la toma de una alícuota de la suspensión celular de manera estéril

Durante los experimentos realizados en biorreactor, la concentración y viabilidad celular se han determinado mediante un contador automatizado Scepter (Millipore, Fig. 9.4A). Este equipo es un citómetro portátil que se puede usar con una sola mano, a modo de micropipeta y que utiliza unos sensores desechables. Estos sensores constan de unos microcanales por los que circula la muestra, y de unos sensores de impedancia capaces de determinar el tamaño, el volumen y el N° de partículas que los atraviesan. El equipo dispone de una pantalla LCD donde se muestran los datos, a modo de Histograma (Fig. 9.4B), indicando el N° de células viables en la muestra de manera directa.



**Figura 9.4:** Partes del contador automático Scepter (A): 1. Pantalla, 2. Émbolo, 3. Empuñadura, 4. Puerto de encaje del sensor, 5. Punta del sensor, 6. Entrada del cable, 7. Botón de control, 8. Cobertura del filtro. Histograma mostrado en pantalla (B): 1. Grafico de contaje versus diámetro, 2. Concentración celular de la muestra, 3. Volumen medio de las células en la zona seleccionada, 4. Diámetro medio de las células en la zona seleccionada.

### 9.5.2 Determinación de la concentración de glucosa y lactato

La determinación se realiza sobre el sobrenadante centrifugado (1000g, 5 min.) y filtrado a 0,45µm (Millex, Millipore), obtenido a partir de la toma de una alícuota de la suspensión celular de manera estéril.

La concentración de glucosa y lactato se mide con un analizador automático YSI (Yellow Springs Instruments, 2700 Select). Este aparato dispone de un electrodo formado por una fina membrana con enzimas inmovilizadas que rodea un ánodo de platino. Las moléculas de glucosa o L-lactato presentes en la muestra difunden a través de la membrana y sufren una transformación enzimática por acción de las enzimas glucosa oxidasa y lactato oxidasa. Estas reacciones liberan electrones que son finalmente detectados por el electrodo. La intensidad de las señales eléctricas producidas es proporcional a la concentración de cada uno de los dos sustratos. Esta medida eléctrica no se ve afectada por el color, turbidez, densidad o temperatura de la muestra, y sólo precisa que la alícuota tomada por la medida sea filtrada o centrifugada con anterioridad para eliminar las células o impurezas que puedan obstruir la membrana.

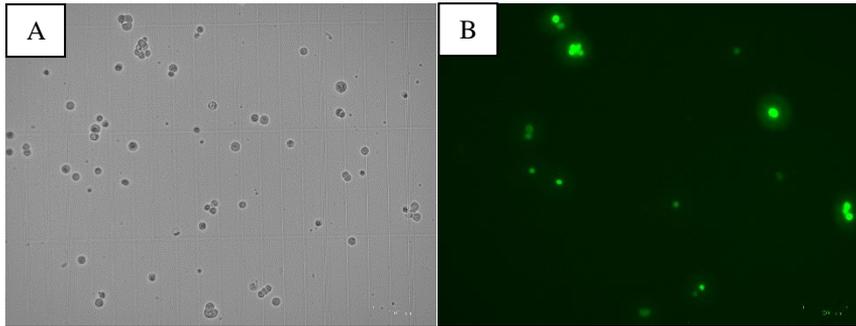
El analizador toma 55µl de cada muestra y da los valores de concentración de glucosa y lactato en (g/l). El rango de concentraciones que puede medir el aparato oscila de 0,05 a 20,0 g/l para la glucosa y de 0,005 a 2,00 g/l para el lactato. Si se ha de diluir la muestra, hay que hacerlo con agua ultrapura.

### **9.5.3 Determinación de la eficacia de transfección mediante microscopia de fluorescencia**

La determinación se realiza a partir de la toma de una alícuota de la suspensión celular de manera estéril.

Se usa el microscopio de contraste de fases y epifluorescencia Olympus BH-2. Este equipo permite la iluminación de la muestra con luz UV filtrada con un filtro dicróico DM500 más un filtro de excitación B-460, irradiando una luz azul de longitud de onda 460-520nm. Esto permite la excitación y la observación de la eGFP (Excitación a 495nm, emisión a 520nm). Para calcular la eficiencia de transfección, contar 4 campos de hematocitometro observando mediante contraste de fases (Fig 9.5A), y repetir el conteo observando los mismos campos mediante epifluorescencia (Fig 9.5B). La eficiencia de transfección se calcula según la siguiente expresión:

$$\%eGFP^+ = \frac{N^{\circ} \text{ células fluorescentes} * 100}{N^{\circ} \text{ células totales}}$$

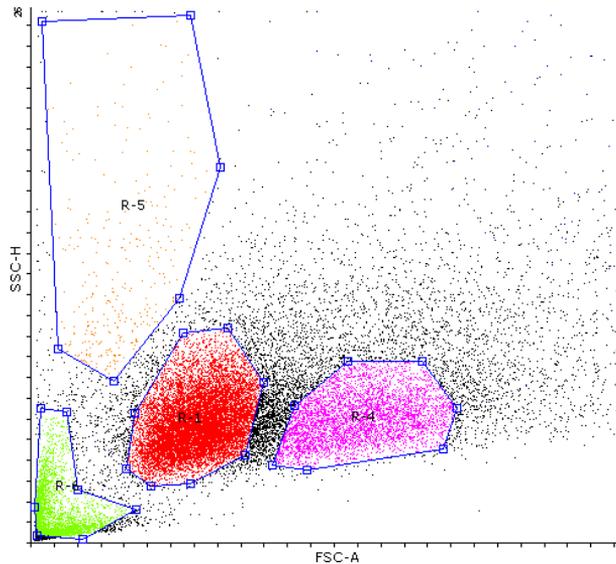


**Figura 9.5. Imágenes microscópicas de contraste de fases (A) y epifluorescencia (B) para la determinación de la eficiencia de transfección.**

#### **9.5.4 Análisis de poblaciones celulares mediante citometría de flujo**

El citómetro de flujo es un aparato que permite el análisis de poblaciones celulares a partir de la separación de células individuales en un flujo de líquido laminar. Las células pasan una a una por un detector que permite determinar su tamaño (*Forward Scatering*, FSC), la complejidad intracelular (*Side Scatering*, SSC) y la fluorescencia en diferentes canales y longitudes de onda. Los parámetros se representan en gráficos DotPlot (Fig. 9.6), en las que se delimita la composición de la población a analizar (*gating*). En el presente trabajo, se ha usado el Citómetro de flujo FACS Canto, del Servei de Citometria i Anticossos del Institut de Biotecnologia i Biomedicina de la Universitat Autònoma de Barcelona.

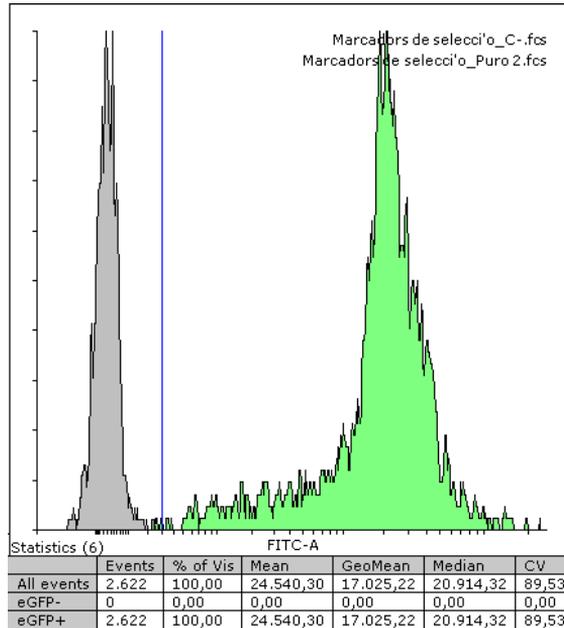
Los análisis se han realizado sobre la población unicelular, excluyendo células muertas (Determinadas mediante la tinción con Yoduro de Propidio) y agregados. Se han realizado dos tipos de análisis: Determinación de la eficacia de transfección (% de células eGFP+) y determinación de los niveles relativos de secreción de producto de interés mediante inmunomarcaje tras captura en frío. Los resultados se han analizado usando los programas Flowing Software (Turku University) y FACSDiva (BD Biosciences).



**Figura 9.6. Dotplot de Citometría mostrando varias regiones (Gates): Población unicelular (R-1), debris celular (R-6), agregados (R-4), células muertas (R-5).**

*9.5.4.1 Determinación de la eficiencia de transfección y el nivel de expresión de eGFP mediante citometría de flujo*

El análisis se realiza sobre la población unicelular (R-1) en células transfectadas con plásmidos que contengan eGFP usando el canal FITC. Los datos se presentan en un histograma que muestra la fluorescencia en el eje X y el N° de células en el ejeY (Fig 9.7). Se ha de pasar un control con células no transfectadas para establecer el valor mínimo de fluorescencia a partir del que se realizará al cálculo. Las células con un nivel de fluorescencia inferior no deben ser incluidas como células fluorescentes. Una vez establecido este límite, el software devuelve automáticamente el resultado en %eGFP+ y el valor promedio de fluorescencia, correspondiente al nivel de expresión de eGFP.



**Figura 9.7. Histograma mostrando células no transfectadas (gris) y transfectadas (verde), junto con el %eGFP+ y el nivel de expresión de eGFP (unidades arbitrarias)**

*9.5.4.2 Determinación de los niveles relativos de secreción de producto de interés mediante inmunomarcaje tras captura en frío*

Esta técnica es una adaptación del protocolo de Brezinsky et al<sup>3</sup>, basado en el marcaje transitorio de las células con anticuerpos que reconocen el producto de interés. Dado que la mayoría de productos bioterapéuticos son secretados, se someten las células a una T<sup>a</sup> de 4°C para ralentizar la secreción del producto de interés y posteriormente, se marcan con un anticuerpo conjugado a un fluorocromo. Las muestras se analizan mediante citometría de flujo, siendo teóricamente proporcional el nivel de fluorescencia a la producción específica de la población o línea celular analizada. El marcaje de las células se realiza como sigue:

1. Se centrifugan a 2000g, durante 2min, 1x10<sup>6</sup> células en un eppendorf de 1,5mL, no es necesaria la esterilidad, excepto si se va a realizar *cell-sorting* en lugar de un análisis de citometría (El protocolo de marcaje es el mismo, pero usando soluciones estériles).

2. Se resuspende el pellet en 1mL de DPBS y se centrifuga de nuevo (mismas condiciones)
3. Se resuspende en 100 $\mu$ L de DPBS conservado a 4°C
4. Se añade 1 $\mu$ L de anticuerpo de marcaje conjugado a ficoeritrina (PE) (MHCIFG04 para el IFN $\gamma$  y 12-4998-82 para el trastuzumab, Thermo)
5. Se incuban las células en hielo durante 30 minutos
6. Se centrifugan las células para eliminar los anticuerpos no adheridos, realizando dos lavados del pellet con 1mL de PBS (Resuspension + centrifugación).
7. Se resuspende el pellet en 1mL de PBS y se analiza mediante citometría de flujo de manera análoga al análisis de eGFP, usando el canal PE en lugar del FITC.

## **9.6 Análisis de los productos.**

### **9.6.1 Determinación de la concentración de interferón gamma**

La determinación se realiza sobre el sobrenadante centrifugado (1000g, 5 min.) y filtrado a 0,45 $\mu$ m (Millex, Millipore), obtenido a partir de la toma de una alícuota de la suspensión celular de manera estéril.

La concentración de IFN $\gamma$  se realiza mediante ELISA usando el kit comercial Novex (CHC1233, Thermo), siguiendo las instrucciones del fabricante. El kit contiene los elementos necesarios para la detección y cuantificación inmunológica del IFN $\gamma$  humano, usando la técnica conocida como ELISA “sándwich”, en la que se usa un anticuerpo monoclonal inmovilizado en una placa de poliestireno para capturar por afinidad inmunológica el IFN $\gamma$  presente en las muestras de cultivo (Anticuerpo primario, o de captura). Posteriormente, se añade un anticuerpo policlonal biotinilado, capaz de reconocer el IFN $\gamma$  en diferentes puntos de la molécula con el fin de amplificar la señal (Anticuerpo secundario, o de detección). El último elemento del kit es una molécula de Peroxidasa de rábano (HRP), conjugada con estreptavidina, que reconoce al anticuerpo de detección a través de la interacción estreptavidina-biotina. La HRP produce un cambio cromogénico cuando se añade el sustrato TMB (3,3',5,5'-

Tetrametilbenzidina), virando este a un color azul. La intensidad del color es proporcional a la concentración de IFN $\gamma$ . Con el kit se suministra un estándar de concentración conocida. El protocolo es el siguiente (Las cantidades son suficientes para un ELISA correspondiente 1 placa de 96 pocillos, suficiente para 5-10 muestras según las diluciones a realizar):

1. Diluir 10 $\mu$ L de anticuerpo de captura en 10mL de tampón DPBS (Hyclone)
2. Pipetear 100 $\mu$ L de la solución de captura en cada pocillo de una placa Maxisorp (Nunc). Cubrir la placa con el film de cobertura dispuesto al efecto e incubar la misma 16h a 4°C.
3. Vaciar la placa y lavar 3 veces los pocillos con 200 $\mu$ L de solución de lavado (DPBS+0,05% Tween20, DPBS-T). Volver a vaciar la placa y secar dando golpes sobre un paño de microfibra (Kimwipe)
4. Añadir 200 $\mu$ L solución de ensayo a cada pocillo e incubar la placa durante 1h a T<sup>a</sup> ambiente.
5. Repetir lavado (Paso 3)
6. Diluir el estándar de concentración conocida en solución de ensayo (DPBS-T + 0,5% Albúmina bovina), hasta 2ng/mL.
7. Diluir las muestras con tampón de ensayo, en base al rango de concentración esperado.
8. Añadir 100 $\mu$ L de DPBS-T a cada pocillo de la placa, exceptuando la fila A.
9. Añadir 200 $\mu$ L de los estándares en los pocillos A1 y A2. Añadir 200 $\mu$ L de muestra en los pocillos A3 en adelante, según el número de muestras.
10. Realizar una dilución seriada de muestras y patrones tomando 100 $\mu$ L de los pocillos de la fila A y pasándolos a la fila B, y así consecutivamente, exceptuando los pocillos H1 y H2, que son control negativo del ensayo (0 de la recta de calibrado).
11. Preparar la solución de anticuerpo primario diluyendo 4,4 $\mu$ L de anticuerpo de detección en 5,5mL de solución de ensayo
12. Añadir 50 $\mu$ L de solución de anticuerpo primario a cada pocillo. Incubar la placa a T<sup>a</sup> durante 2h

13. Repetir lavado (Paso3)
14. Preparar la solución de Peroxidasa diluyendo 2 $\mu$ L de Estreptavidina-HRP en 10mL de solución de ensayo
15. Añadir 100 $\mu$ L de solución de peroxidasa a cada pocillo. Incubar la placa a T<sup>a</sup> durante 30min.
16. Repetir lavado (Paso3)
17. Añadir 100 $\mu$ L de solución de revelado TMB (T8665, Sigma) a cada pocillo. Incubar la placa a T<sup>a</sup> durante 30min.
18. Detener la reacción pipeteando 100 $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20% en cada pocillo.
19. Leer la placa en un lector de microplacas. Se ha de determinar la absorbancia a 405nm y a 600nm. El valor de cada pocillo será la diferencia entre ambas absorbancias
20. Construir una recta de calibrado usando los valores de los estándares e interpolar los valores de las muestras usando las diluciones que presenten una absorbancia dentro de la recta de calibrado construida.

### **9.6.2 Determinación de la concentración de trastuzumab**

La determinación se realiza sobre el sobrenadante centrifugado (1000g, 5 min.) y filtrado a 0,45 $\mu$ m (Millex, Millipore), obtenido a partir de la toma de una alícuota de la suspensión celular de manera estéril.

La concentración de trastuzumab se determina mediante un protocolo de ELISA desarrollado en el presente trabajo en base al método de ELISA indirecto de Kazumi et al. El método es similar al descrito para el IFN $\gamma$ , inmovilizándose en la placa el antígeno HER2 (Sinobiological), a modo de captura, y usando las muestras que contienen trastuzumab como anticuerpo primario. El trastuzumab es después reconocido por un anticuerpo policlonal anti-IgG Humanas (Genscript) conjugado a HRP. El protocolo es como se describe:

Preparar las siguientes soluciones:

- Solución Anti-HER2 antígeno (0,5  $\mu$ g/mL) en DPBS
- Solución Patrón Trastuzumab (1  $\mu$ g/mL) en DPBS
- Anticuerpo Anti-IgG1 humana conjugado HRP (1mg/mL) en DPBS

- Tamón de dilucion PBS 1x (Hyclone)
  - Solucion de bloqueo DPBS-T 0,05%+NFSM 3% (70166, Sigma)
  - Solucion de lavado DPBS-T 0,05%
1. Calcular en la placa (Maxisorp, Nunc) la cantidad de pocillos necesarios para el test. *\*Serán necesarias, al menos, dos columnas para estandares+blanco (8 pocillos cada una).*
  2. Pipetear 50µL de Anti-HER2 antígeno (1µg/mL) en cada pocillo, cubrir la placa con la cubierta plastica e incubar a 4°C, 16h.
  3. Decantar el contenido de la placa.
  4. Lavar la placa 3 veces con 200 µL de solución de lavado, decantando el contenido de la placa entre lavados
  5. Secar la placa contra un paño de microfibras con golpes suaves
  6. Pipetear 100 µL de Solución de bloqueo en cada pocillo. Cubrir la placa e incubar a T<sup>a</sup> ambiente durante 1h
  7. Proceder como en 5.
  8. Pipetear 50 µL de buffer de dilucion PBS en todos los pocillos
  9. Pipetear 50µL de patrón trastuzumab en los pocillos A1 y B1.
  10. Efectuar una dilucion seriada 1/2 en la placa desde la fila 1 a la 7, pipeteando 50 µL entre pocillos. Descartar los 50 µL finales
  11. Pipetear 50µL de muestra a determinar en los pocillos predeterminados de la columna 1. *\*La muestra habrá de diluirse en consecuencia si se espera una concentración superior a maxima del estándar.*
  12. Efectuar una dilucion seriada 1/2 en la placa desde la fila 1 a la 8, pipeteando 50 µL entre pocillos. Descartar los 50 µL finales
  13. Pipetar 50µL de PBS en los pocillos de blanco.
  14. Efectuar una dilucion seriada 1/2 en la placa desde la fila 1 a la 8, pipeteando 50 µL entre pocillos. Descartar los 50 µL finales. Cubrir la placa e incubar a RT durante 1h
  15. Proceder como en 2.

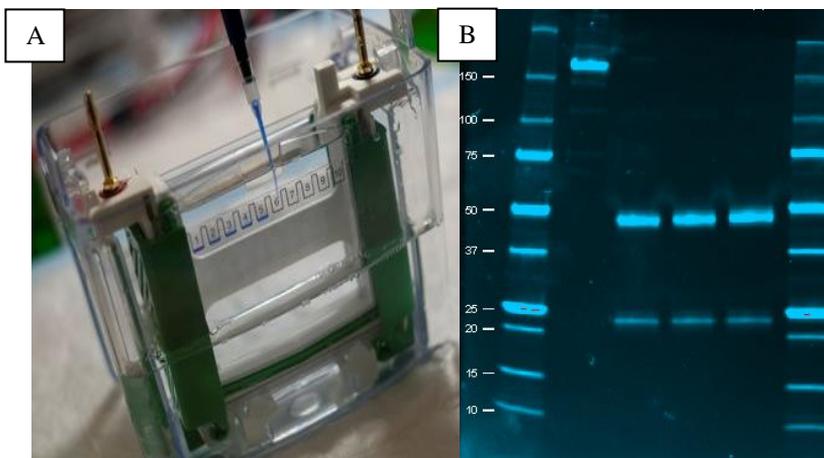
16. Pipetear 50  $\mu\text{L}$  de una solución de anticuerpo secundario [4] diluido 1:10000 (0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en todos los pocillos. Cubrir la placa e incubar a RT durante 1h
17. Proceder como en 2.
18. Pipetear 50  $\mu\text{L}$  de solución de revelado TMB. Incubar a RT durante un tiempo de 20 minutos máximo *\*Se puede incubar menos tiempo si la reacción es más rápida de lo previsto para evitar la saturación de la señal.*
19. Detener la reacción añadiendo a cada pocillo 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  20%.
20. Leer la placa en un lector de microplacas. Se ha de determinar la absorbancia a 405nm y a 600nm. El valor de cada pocillo será la diferencia entre ambas absorbancias
21. Construir una recta de calibrado usando los valores de los estándares e interpolar los valores de las muestras usando las diluciones que presenten una absorbancia dentro de la recta de calibrado construida.

#### **9.6.4 Electroforesis de proteínas mediante SDS-PAGE**

La electroforesis de proteínas mediante gel de poliacrilamida es una técnica que permite la separación de proteínas en base a su tamaño tras la aplicación de un campo eléctrico. Las proteínas de la muestra son recubiertas por el SDS presente en el tampón de cargar, adquiriendo una carga negativa y posteriormente, son separadas en un gel de poliacrilamida de diferente tamaño de poro en función del porcentaje. Los geles pueden realizarse en tres condiciones básicas:

- Condiciones nativas: No se añade SDS, las proteínas migran en función de su carga eléctrica nativa y de su conformación tridimensional
- Condiciones desnaturizantes: Se añade SDS, detergente que rompe las interacciones débiles entre las subunidades proteínas y elimina la estructura terciaria de la proteína, excepto si está unida mediante puentes disulfuro. Las proteínas migran en función de su tamaño.
- Condiciones desnaturizantes reductoras: Se añade  $\beta$ -mercaptoetanol o DTT a las muestras, además del SDS, para romper los puentes disulfuro y dividir la proteína en las cadenas peptídicas de las que esté compuesta.

Durante el presente trabajo, se han usado geles MiniProtean *TGX StainFree* (4568095, Biorad). Estos geles son geles prefabricados (Fig. 9.8A), y contienen un compuesto trihalometano que reacciona con los triptófanos que contienen las proteínas. Este compuesto permite la visualización directa de las proteínas tras irradiar los geles con luz UV (Fig. 9.8B).



**Figura 9.8:** Carga de un gel precast (A). Gel precast Stainfree tras el revelado, mostrando las cadenas del trastuzumab en condiciones no-reductoras (1er carril tras marcador de peso molecular) y reductoras (resto).

El protocolo de preparación de muestra se describe a continuación:

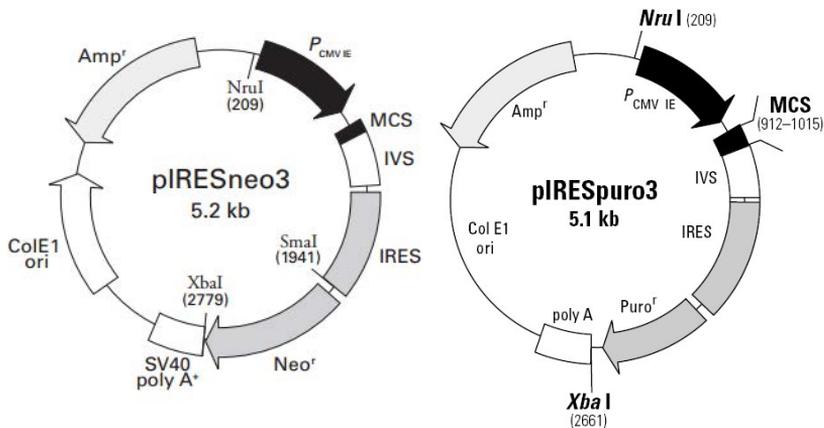
1. Mezclar 7,5 $\mu$ L de muestra con 7,5 $\mu$ L de tampón de carga Laemli 2x (1610737, Biorad) en un tubo de 0,5mL. Añadir 0,75mL de  $\beta$ -mercaptoetanol en caso de realizar el gel en condiciones reductoras
2. Incubar las muestras a 95°C durante 5 minutos en un termociclador
3. Cargar las muestras en el gel, evitando pasar parte de la muestra a otros pocillos o pinchar el pocillo
4. Aplicar 250V durante 20 minutos a la cámara de electroforesis.
5. Desmontar la cámara, sacar el gel y desmontar la carcasa del gel. Colocar el gel en una cubeta con H<sub>2</sub>O destilada.
6. Inmediatamente, exponer el gel durante 90s a luz UV usando el equipo GelDocEZ (Biorad).
7. Documentar el gel y guardar una copia de seguridad en una memoria USB.

## 9.7 Vectores plasmídicos

Para la construcción de los vectores recombinantes construidos en el presente trabajo se ha partido de los vectores pIRESneo3 (Clontech) y pIRESpuro3 (Clontech). Alternativamente, se ha operado con vectores pUC57 y pJET2.1 con el propósito de realizar clonaciones.

### 9.7.1 Vectores base

#### 9.7.1.1 pIRESpuro3 y pIRESneo3

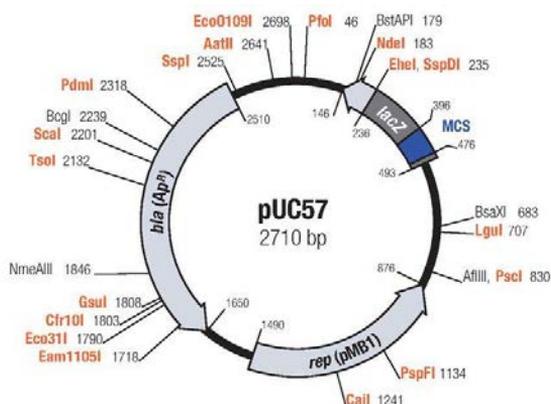


**Figura 9. pIRESneo3 (Izquierda) y pIRESpuro3 (Derecha)**

El pIRESneo3 y el pIRESpuro3 (Fig. 9.9) son unos vectores de expresión bicistónicos de unas 5.2 Kb y 5.1 Kb, respectivamente. Estos plásmidos contienen una secuencia IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) del virus de la encefalomiocarditis (ECMV) el cual permite que la traducción de dos ORFs (*Open Reading Frame*) a partir de un único RNA mensajero: El gen de interés y un marcador de selección eucariota que consisten en un gen que proporciona resistencia a la neomicina G418 (*nptIII*, pIRESneo3) o a la puromicina (*pac*, pIRESpuro3). Dispone de un promotor de Citomegalovirus ( $P_{CMVIE}$ ) que presenta un elevado nivel de expresión en un gran número de células animales y un MCS (*Multiple Cloning Site*) donde se insertará la secuencia deseada. La señal de poliadenilación los mRNA transcritos es del virus SV40 y se usa para detener la transcripción. Estos plásmidos se pueden replicar en *E.coli*, gracias a la presencia de un origen de replicación ColE1, lo que permite la obtención de cantidades

significativas de los mismos. La selección de las colonias que han incorporado el plásmido en se realiza gracias a un marcador de selección que confiere resistencia a la ampicilina ( $\beta$ -lactamasa, *bla*). El vector pIRESpuro3 es la base de la mayoría de vectores construidos durante el trabajo de tesis.

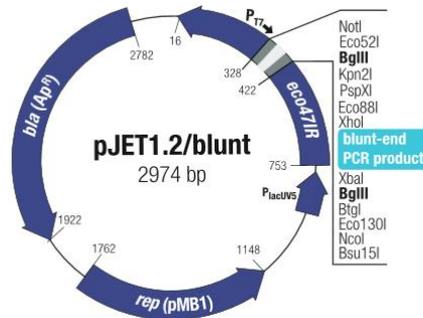
### 9.7.1.2 pUC57



**Figura 9.10. pUC57**

Es un vector de clonación estándar de *E.coli*, compuesto por un origen de replicación (pMB1), el gen *bla* para la selección por ampicilina y un MCS integrado dentro del gen *lacZ* (Fig.9.10). Estas características permiten la selección de bacterias que han incorporado un determinado inserto mediante el sistema de screening Azul/blanco. La inserción de una secuencia en el MCS produce la disrupción del gen *lacZ*, que provoca el fin de la expresión de la enzima codificada ( $\beta$ -galactosidasa), lo que permitirá la distinción de las colonias en placas que contengan IPTG y el sustrato cromogenico X-gal (Las colonias correctas aparecerán blancas, en contraste con las colonias que expresen *lacZ*, que serán azules.). Este vector ha sido usado durante el trabajo de tesis por su papel como portador de los genes sintéticos suministrados por Genscript.

### 9.7.1.3 pJET1.2



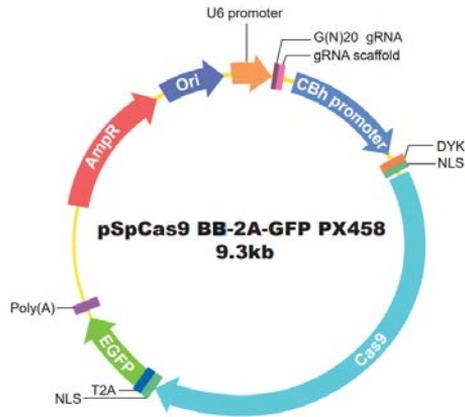
**Figura 9.11. pJET1.2**

Es un vector de clonación análogo al pUC57 (suministrado por Thermo, Fig. 9.11), consta de los mismos elementos, sustituyendo el gen *lacZ* por el gen *eco47IR*. Este gen codifica una enzima de restricción letal para *E.coli*. En este caso, cuando se realiza una clonación, se disrupta este gen, permitiendo solamente el crecimiento de las bacterias que hayan integrado vectores con el inserto. De esta forma, todas las colonias obtenidas en la placa son positivas. En el trabajo de tesis se ha usado para subclonar los fragmentos obtenidos por PCR cuando ha sido necesario, por ser su clonación directa demasiado dificultosa. Durante su uso se ha encontrado una eficiencia real del 80% de colonias con inserto.

### 9.7.1.4 pSpCas9 BB-2A-GFP

Vector para la realización de edición genómica usando el sistema CRISPR/Cas9. Consta de una parte bacteriana, con origen de replicación en *E.coli* (OriC) y gen de resistencia a Ampicilina, y de una parte para la expresión transiente en células de mamífero a partir de dos promotores: el sgRNA de elección a partir del promotor U6 y una proteínas de fusión eSpCas9 (*Enhanced specificity Cas9*, 10 veces más específica que la Cas9 original, minimizando los errores *off-target*) fusionada con eGFP a través de un péptido autocatalítico T2A (Fig. 9.12). De esta forma, una vez realizada la transfección, se pueden aislar clones fluorescentes mediante *cell-sorting* en base a la intensidad de la misma, relacionándose esta con

el nivel de expresión de eSpCas9 (Descrito más detalladamente en el apartado 9.9.3)



**Figura 9.12. pSpCas9 BB-2A-GFP**

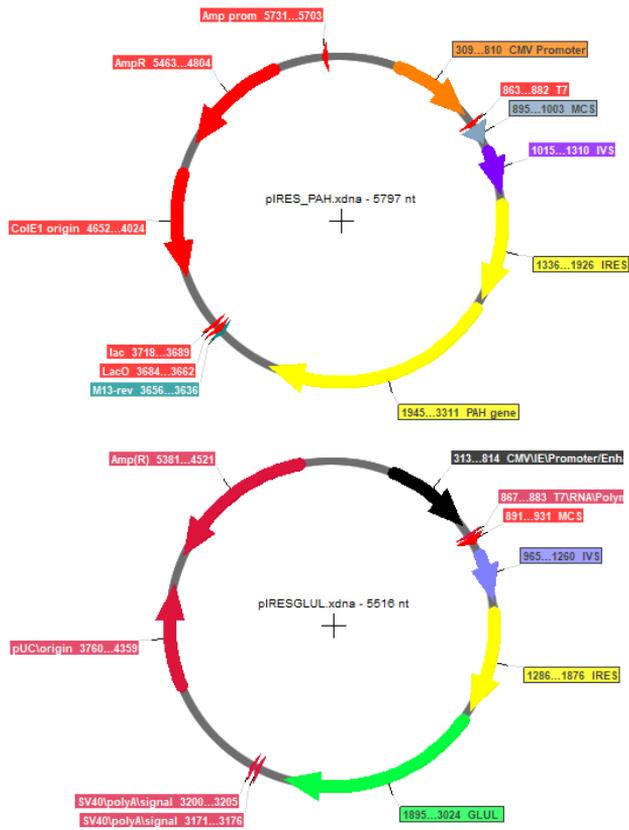
## 9.7.2 Vectores derivados de pIRESpuro3

### 9.7.2.1 pIRESPA $H$

Vector derivado de pIRESpuro3 con la sustitución del gen *pac* (resistencia a puromicina) por el gen *PAH* (Fenilalanina hidroxilasa) entre los sitios Esp3I y XbaI. Usado para la selección de células HEK293 en medio sin tirosina (Fig. 9.13, arriba).

### 9.7.2.2 pIRESG $LUL$

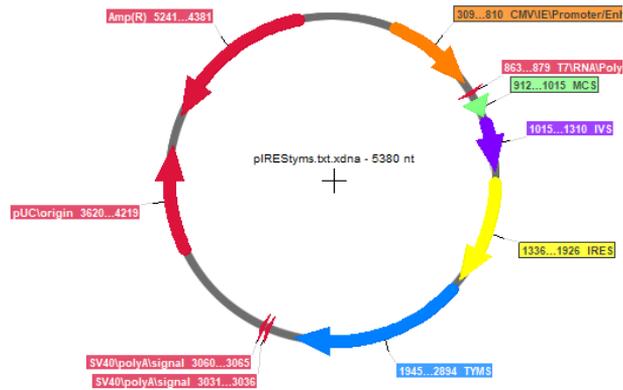
Vector derivado de pIRESpuro3 con la sustitución del gen *pac* (resistencia a puromicina) por el gen *GLUL* (Glutamina sintetasa) entre los sitios Esp3I y XbaI. Usado para la selección de células HEK293\_4C3 en medio sin glutamina (Fig. 9.13, abajo).



**Figura 9.13. pIRESPA<sub>H</sub> (Arriba) y pIRESG<sub>LUL</sub> (Abajo)**

### 9.7.2.3 pIREST<sub>YMS</sub>

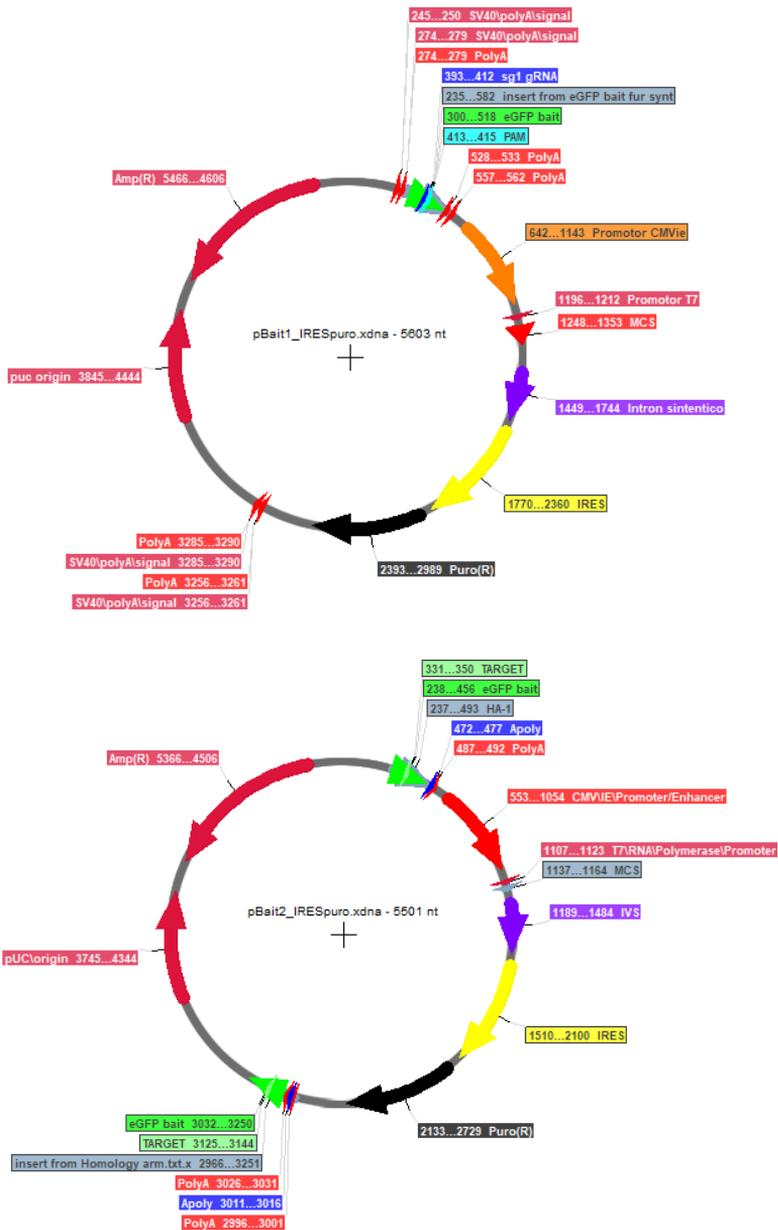
Vector derivado de pIRESpuro3 con la sustitución del gen *pac* (resistencia a puromicina) por el gen *TYMS* (Timidilato sintasa) entre los sitios Esp3I y XbaI. Usado para la selección de células HEK293\_2C10 en medio sin timidina (Fig. 9.14).



**Figura9.14. pIRESTYMS**

#### 9.7.2.4 pBait1\_IRESpuro y pBait2\_IRESpuro

Vectores derivados de pIRESpuro3 con una (pBait1\_IRESpuro, Fig. 9.15, arriba) o 2 (pBait2\_IRESpuro, Fig. 9.15, abajo) secuencias de integración microhomóloga (MHA, *Microhomology arm*) para la integración dirigida usando CRISPR/Cas9. Las secuencias flanquean el *cassette* de expresión y están clonadas entre los sitios MluI y BcuI (MHA1) y XbaI y KspAI (MHA2). Las secuencias de microhomólogas están formadas por un fragmento del ORF del gen codificante de la proteína eGFP, coincidente con la zona de integración en el genoma de la célula hospedadora N1D8. En este fragmento está incluida la secuencia PAM (*Promoter adjacent motif*), reconocida por el complejo sgRNA-Cas9, y la zona de corte NGG. Además, dispone de cuatro secuencias de poliadenilación del virus SV40 para interrumpir forzosamente la transcripción del gen eGFP en el cual se integrará. Las secuencias están colocadas de tal forma que interrumpen la transcripción independientemente de la orientación en la que se dé la integración (5'-3' o 3'-5' con respecto al vector de integración).



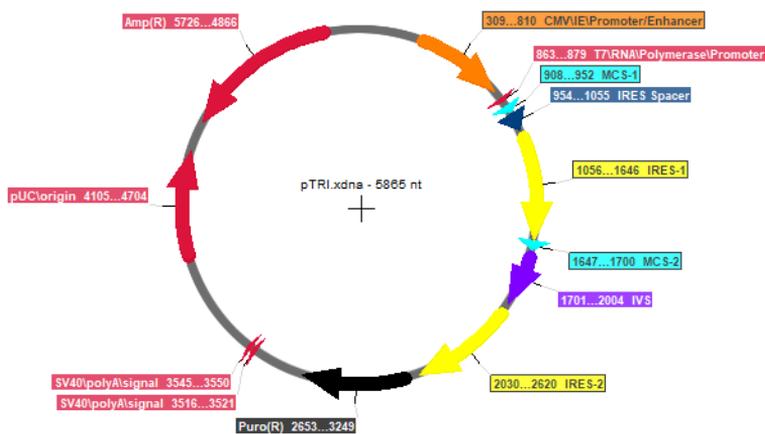
**Figur 9.15. pBait1\_IRESpuro (Arriba) y pBait2\_IRESpuro (Abajo)**

9.7.2.5. *pTRIpuro*

Es un vector tricistronico derivado del pIRESpuro3 que permite la clonación y expresión de tres genes simultáneamente, dos de interés y el marcador de selección (Fig. 9.16). Se ha usado para la expresión de las dos cadenas de

trastuzumab. Para ello, se diseñó una secuencia sintética denominada IRES1PS, que consta de un espaciador sintético equivalente al intrón IVS y otra secuencia IRES, todo ello flanqueado por las dos dianas más internas que había en el MCS del vector pIRESpuro3. Al clonarlo, se ha obtenido un vector con dos MCS que permite la clonación de dos genes de interés acoplados a la expresión del marcador de selección.

De este vector se han construido, a su vez, derivados equivalentes a los antes descritos para el pIRESpuro, siguiendo las mismas metodologías.



**Figura 9.16. pTRIpuro**

### 9.7.3 Vectores de expresión contruidos en el trabajo de tesis

Tabla 4Bloque	Vector	Características
<b>Prueba de promotores</b>	pCMV_eGFP_IRESpuro	Expresión de eGFP desde diferentes promotores, selección mediante puromicina
	pEF-1a_eGFP_IRESpuro	
	pCAG_eGFP_IRESpuro	
<b>Evaluación de péptidos señal</b>	pSPIFN $\alpha$ _eGFP_IRESpuro	Secreción de eGFP al exterior celular. Diferentes péptidos señal (IFN $\alpha$ 2, IFN $\gamma$ , Albumina, Inmunoglobulina G, Interleuquina 2, Luciferasa de Gaussia). Selección mediante puromicina.
	pSPIFN $\gamma$ _eGFP_IRESpuro	
	pSPALB_eGFP_IRESpuro	
	pSPIGG_eGFP_IRESpuro	
	pSPIL2_eGFP_IRESpuro	
	pSPIFN_eGFP_IRESpuro	
<b>Expresión de biomoléculas</b>	pIFN $\gamma$ _IRESpuro	Expresión de IFN $\gamma$ , selección mediante puromicina
	pLC1_IRESneo	Expresión de la cadena ligera del trastuzumab, selección mediante G418
	pHC5_IRESpuro	Expresión de la cadena pesada del trastuzumab, selección mediante puromicina
	pTRI_TRA_IRESpuro	Expresión de trastuzumab, selección mediante puromicina
	pSPIFN_iIFN $\gamma$ _IRESpuro	Expresión de IFN $\gamma$ y trastuzumab con péptido señal mejorado de IFN $\alpha$ 2 selección mediante puromicina
	pTRI_iTRA_IRESpuro	
<b>Marcadores de selección</b>	peGFP_IRES $PAH$	Expresión de eGFP, selección con diferentes marcadores de selección metabólicos (PAH, GLUL, TYMS)
	peGFP_IRES $GLUL$	
	peGFP_IRES $TYMS$	
	pIFN $\gamma$ _IRES $GLUL$	Expresión de IFN $\gamma$ y trastuzumab, selección mediante glutamina sintetasa
	pTRI_iTRA_IRES $GLUL$	
<b>Integración dirigida</b>	pBait1_IFN $\gamma$ _IRESpuro	Expresión de IFN $\gamma$ . 1 o 2 brazos de microhomología para integración dirigida. Selección con puromicina.
	pBait2_IFN $\gamma$ _IRESpuro	
	pTRI_Bait1_TRA_IRESpuro	Expresión de Trastuzumab. 1 o 2 brazos de microhomología para integración dirigida. Selección con puromicina.
	pTRI_Bait2_TRA_IRESpuro	

## 9.8 Técnicas de Biología molecular.

### 9.8.1 Extracción y purificación de DNA plasmídico

Para la preparación de cantidades significativas de los vectores anteriormente descritos, se ha usado el kit *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (K0503, ThermoFisher Scientific), según las instrucciones del fabricante:

1. Inocular un cultivo de 5 ml de LB+Ampicilina a partir de una colonia, en un erlenmeyer de 50 mL.
2. Incubar a 37°C, el cultivo durante 16h. Es importante que la temperatura no sea inferior en el caso de plásmidos con origen de replicación plasmídica o derivados, ya que la replicación plasmídica se ve afectada y se obtienen rendimientos muy inferiores.
3. Transferir 1.5mL del cultivo a un tubo, centrifugar a 6.800g durante 2 minutos y eliminar el sobrenadante
4. Resuspender el pellet en 250µl de la solución de resuspensión. Resuspender completamente mediante pipeteo o vórtex.
5. Añadir 250µl de la solución de lisis y mezclar mediante inversión del tubo 4-6 veces, hasta que la solución se vuelve viscosa y ligeramente clara. Esto lisa las células de forma alcalina: el ADN se libera del interior celular y se desnaturaliza.
6. Añadir 350µl de solución de neutralización y mezclar inmediatamente mediante inversión del tubo 4-6 veces. La solución de neutralización neutraliza el pH de la solución que contiene el lisado, de modo que el DNA plasmídico, gracias a su reducido tamaño, es capaz de renaturalizarse, mientras que el DNA genómico no lo hace, y se asocia a proteínas y otros elementos celulares.
7. Centrifugar a máxima velocidad durante 5 minutos, para sedimentar el debris celular y el DNA cromosómico. El DNA plasmídico permanece en el sobrenadante.
8. Transferir el sobrenadante a la columna GeneJET mediante decantación o pipeteo. Evitar tocar el pellet.

9. Centrifugar la columna durante 1 minuto a máxima velocidad. Descartar el líquido que ha pasado a través de la columna y colocar de nuevo la columna a su tubo de recolección.
10. Añadir 500 µl de la solución de lavado. Centrifugar durante 60 segundos a máxima velocidad y descartar el líquido que ha pasado a través. Volver a colocar la columna su tubo de recolección.
11. Centrifugar durante 1 minuto a máxima velocidad la columna vacía, para eliminar los restos de etanol presentes en la solución de lavado.
12. Transferir la columna a un tubo eppendorf de 1.5 mL. Añadir 50µL de la solución de elución en el centro de la membrana de la columna para eluir el ADN plasmídico. Vigilar de no tocar la membrana. Mantenerlo 2 minutos a temperatura ambiente.
13. Centrifugar durante 2 minutos a máxima velocidad.
14. Guardar el DNA a -20°C y descartar la columna.

### **9.8.2 Extracción y purificación de DNA genómico**

Para la extracción de DNA genómico a partir de una muestra de cultivo celular ( $3 \times 10^6$  cell/mL, 0,3mL de volumen), se usa el método clásico de extracción mediante Fenol-Cloroformo:

1. Centrifugar la muestra 5min a 500g. Descartar el sobrenadante
2. Resuspender en 100µL de PBS.
3. Añadir 200µL de tampón de digestión (100mM NaCl, 10mM Tris, 25mM EDTA, 0,5% p/v SDS, 0,1mg/mL Proteinasa K, pH:8,0
4. Incubar durante 5min a T<sup>a</sup> ambiente
5. Añadir 300µL de fenol/cloroformo/Isoamilalcohol 25:24:1 (P2069, Sigma) en la campana de extracción de gases e invertir el tubo hasta que las fases se han mezclado. No aplicar vórtice ya que se podría romper el DNA.
6. Centrifugar a máxima velocidad durante 5 minutos. Aparecerá una capa blanca (proteínas) en la interfase entre la fase acuosa superior y la orgánica inferior
7. Transferir la fase acuosa a un nuevo eppendorf de 1,5mL.

8. Repetir las etapas de la 5 a la 7 hasta que no aparezca la capa blanca.
9. Añadir un volumen equivalente de cloroformo a la fase acuosa extraída. Mezclar bien mediante inversiones del tubo.
10. Centrifugar a máxima velocidad durante 5 minutos.
11. Transferir la fase acuosa a un nuevo eppendorf de 1.5 mL.
12. Añadir 2,5-3 volúmenes de etanol absoluto frío (almacenado en el congelador) y mezclar suavemente (La precipitación del DNA se hace visible).
13. Incubar el tubo a -80°C durante un mínimo de 30 minutos.
14. Centrifugar a máxima velocidad durante 5min.
15. Descartar el sobrenadante y añadir 1mL de etanol 70% (almacenado a temperatura ambiente). Invertir 4-6 veces el tubo. No vortexar.
16. Centrifugar durante 2 minutos a máxima velocidad. Descartar cuidadosamente el sobrenadante y secar con aire el pellet.
17. Resuspender el DNA en 50µL de buffer Tris-HCl y conservarlo a -20°C

### **9.8.3 Extracción de RNA total**

Para la extracción de RNA total a partir de una muestra de cultivo celular ( $3 \times 10^6$  cell/mL, 0,3mL de volumen), se ha usado el reactivo Trizol (15596026, Invitrogen):

1. Centrifugar la muestra 5min a 500g. Descartar el sobrenadante
2. Añadir 700µL de Trizol. Pipetear para romper las células
3. Incubar durante 5 minutos a Tª ambiente.
4. Añadir 180µL de cloroformo.
5. Centrifugar a máxima velocidad durante 15min a 4°C.
6. Transferir la fase acuosa superior a un nuevo tubo, evitando transferir nada de la interfase o de la fase orgánica inferior.
7. Añadir 0,5mL de Isopropanol e incubar durante 10 minutos.
8. Centrifugar a máxima velocidad durante 10 minutos.
9. Descartar el sobrenadante y añadir 1mL de etanol 70% (almacenado a temperatura ambiente). Invertir 4-6 veces el tubo. No vortexar.

10. Centrifugar durante 2 minutos a máxima velocidad. Descartar cuidadosamente el sobrenadante y secar con aire el pellet.
11. Resuspender el DNA en 50µL de buffer Tris-HCl y conservarlo a -80°C

#### **9.8.4 Purificación y separación del material genético**

La electroforesis en gel de agarosa se basa en la separación de fragmentos de ADN sometidos a un campo eléctrico en presencia de un gel, formado por la agarosa polimerizada, que dificulta la migración del DNA hacia el polo positivo. La movilidad electroforética de los ácidos nucleicos es inversamente proporcional al tamaño de la molécula, pero también depende de otras variables como son la concentración de agarosa, la corriente eléctrica aplicada y la composición en bases nitrogenadas de los propios ácidos nucleicos.

Este es un método simple y efectivo para separar fragmentos de DNA o RNA de diferente tamaño. El tamaño de cada banda obtenida se establece comparando con un marcador que contiene un patrón de ADN de diferentes tamaños conocidas. Este marcador también permite realizar una cuantificación de la cantidad de material genético obtenido en función de la intensidad de la banda. Se utilizan geles de agarosa al 1.5% para separar fragmentos de ADN de hasta 1 Kb y geles de agarosa al 0.8% para fragmentos de ADN más grandes.

La visualización de los fragmentos de ADN se realiza utilizando el colorante SYBR Safe (S33102, Invitrogen), un agente intercalante del DNA que emite fluorescencia al ser irradiado con luz azul a 470nm de longitud de onda. Este compuesto permite detectar hasta 5 ng de DNA.

Para llevar a cabo la electroforesis de DNA se utilizan las siguientes soluciones:

- Tampón de electroforesis TAE (1x): 4 mM Tris (Panreac), 20 mM ácido acético (Panreac), 2 mM EDTA (Panreac)
- Tampón de carga ( 6x) (R0611, Thermo)
- SYBR Safe 10000x
- Agarosa Topvision (R0492, Thermo)

- Marcador de pesos molecular GeneRuler™ Mix, *Ready to use* (SM0334, Thermo)

El tampón de electroforesis se prepara inicialmente a 10x y se guarda a temperatura ambiente. En el momento de ser utilizada se diluye 10 veces con agua ultrapura.

Procedimiento:

1. Se pesa la cantidad correspondiente de agarosa en polvo (p/v) y se añade el volumen correspondiente de tampón TAE (1x).
2. La agarosa se funde en un horno microondas hasta que no queden partículas en suspensión y se deja enfriar hasta 50-55 ° C.
3. Se añade SYBR Safe a la solución de agarosa a razón de 1 µL por cada 10mL de volumen de gel.
4. Se prepara el molde para el gel de agarosa sellado con cinta adhesiva. Se dispone la pinta que formará los pozos de carga de manera que quede a 0.5-1 cm del extremo del molde y que no toque el fondo del molde. La agarosa fundida se dispensa en el molde. Hay que esperar hasta que la agarosa haya solidificado.
5. Se saca el peine para dejar libre los pozos donde se cargarán las muestras, se quita la cinta adhesiva y se sumerge el gel en una cubeta que contiene tampón de electroforesis. El tampón de electroforesis debe cubrir por completo la superficie del gel.
6. Se cargan las muestras de DNA mezcladas previamente con tampón de carga (1 µL de tampón por cada 5 de muestra) en el gel y se inicia la electroforesis teniendo en cuenta que se debe aplicar un voltaje constante que no supere los 5 V/cm (90V, típicamente, para un gel de 50mL)
7. La electroforesis se deja correr hasta que el colorante del tampón de carga (Azul de Bromofenol) alcanza las 2/3 partes de la longitud del gel.

8. Las bandas de ADN se visualizan mediante el equipo GelDoc EZ (Biorad), usando la bandeja transiluminadora UV. El gel ha de documentarse y guardarse una copia de seguridad del archivo en una memoria USB.

#### 9.8.8.1 Purificación de bandas de DNA en geles de agarosa

Para recuperar los fragmentos de DNA separados electroforéticamente, se corta con una cuchilla de afeitar la porción del gel de agarosa que contiene la banda deseada y se purifica con el *GeneJet gel extraction kit*, siguiendo las especificaciones del proveedor:

1. Quitar el gel del equipo GelDoc EZ Imager tras documentarlo y colocarlo sobre el transiluminador MaestroGen.
2. Apagar la luz de la cámara oscura y cortar la banda de interés con una hoja de bisturí y colocarlo en un tubo eppendorf de 1.5 mL.
3. Añadir un volumen 1:1 de tampón de unión al tubo que contiene la banda.
4. Incubar el fragmento a 55°C durante 10 minutos en el baño térmico. Mezclar mediante inversión del tubo cada 2 minutos aproximadamente, para facilitar la disolución de la agarosa. Asegurar que el gel se encuentra completamente disuelto. Hacer un breve vórtex (5 segundos) antes de cargarlo en la columna.
5. Comprobar que el color de la solución es amarillo, ya que indica un pH óptimo para la unión del DNA en la columna. Si el color es naranja o violeta, añadir 10µl de acetato sódico 3M pH 5.2. El color se volverá amarillo.
6. Transferir hasta 800µL de la solución en la columna de purificación GeneJET. Centrifugar durante 60 segundos a 16000g. Descartar el flow-through.
7. Añadir 700µL de tampón de lavado en la columna de purificación GeneJET. Centrifugar durante 60 segundos a 16000g. Descartar el flow-through y colocar la columna de purificación de nuevo al tubo de colección.

8. Centrifugar la columna de purificación GeneJET vacía durante un minuto a 16000g adicional para eliminar completamente cualquier resto residual de tampón de lavado.
9. Transferir la columna de purificación GeneJET en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL limpio. Añadir 30 $\mu$ L de tampón de elución en el centro de la membrana de la columna de purificación GeneJET y centrifugarla a 16000g durante 1 minuto.
10. Descartar la columna de purificación GeneJET y conservar el ADN purificado a -20°C

### **9.8.5 Cuantificación de la concentración de DNA mediante espectrofotometría.**

Para cuantificar el DNA se utilizó la lectura de la absorción a 260 nm ( $A_{260}$ ) con un espectrofotómetro (NanoDrop ND-1000) que da la medida de la concentración de ADN presente en la muestra:

1. Hacer doble clic en el icono ND-1000 de la computadora del laboratorio de Fermentación V (QC / 0077) del Departamento de Ingeniería Química.
2. Seleccionar la opción "Nucleic Acid".
3. Levantar la sonda y pipetear 2 $\mu$ L de agua DEPC al pedestal, y cerrar (bajar) la sonda. Click en OK.
4. Limpiar cuidadosamente con papel el pedestal, de manera a sacar el agua añadida al paso anterior.
5. Levantar la sonda y pipetear 2 $\mu$ L del tampón de elución en el que se encuentre resuspendido el DNA (o agua si ya se ha utilizado para la elución) en el pedestal, para hacer el blanco. Cerrar (bajar) la sonda.
6. Hacer clic en "Blank".
7. Levantar la sonda y limpiar cuidadosamente con un papel.
8. Pipetear 2  $\mu$ L de la muestra en el pedestal, y cerrar (bajar) la sonda.
9. Hacer clic en "Measure sample".
10. Apuntar la concentración (ng/ $\mu$ L) y pureza (relación  $A_{260}/A_{280}$ , y  $A_{260}/A_{230}$ ).

La relación  $A_{260}/A_{280}$  es un indicativo de la pureza de las muestras. Los valores de esta relación comprendidos entre 1.8 y 1.9 para el DNA y 1.9-2.0 para el RNA se consideran aceptables. La relación disminuye en presencia de contaminantes que absorben a 280 nm, como las proteínas. La relación  $A_{260}/A_{230}$  baja (Por debajo de 2,0) indica la presencia de contaminantes tipo fenol, carbohidratos o cloruro de guanidina.

### **9.8.6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*, Reacción en cadena de la polimerasa) es una tecnología utilizada en biología molecular para amplificar una o pocas copias de un fragmento de DNA en varios órdenes de magnitud, lo que genera miles o millones de copias<sup>4</sup>. Esta amplificación puede tener diversas funciones, tales como, partiendo de una muestra con poco DNA, obtener suficiente cantidad para poder trabajar en posteriores aplicaciones o verificar la presencia en una muestra determinada de una secuencia.

El método de la PCR se basa en ciclos térmicos de calentamiento y enfriamiento, que permiten la separación de cadenas del ADN y la acción de replicación del ADN por parte de la enzima DNA polimerasa. Otro elemento imprescindible para el desarrollo de la PCR son los oligonucleótidos o *primers*, secuencias cortas de ADN que permiten la amplificación específica de la región de interés de la muestra de ADN inicial. La DNA polimerasa es térmicamente estable, y a partir de nucleótidos, de oligonucleótidos, y de DNA molde lleva a cabo la reacción de amplificación. A medida que la PCR progresa, el DNA generado sirve, a su vez, como molde, de modo que la región de interés se amplifica exponencialmente.

Los *primers* diseñados en el presente trabajo se encuentran listados en el anexo. A partir de las secuencias extraídas de las bases de datos disponibles en el NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) se diseñaron los cebadores que delimitan las regiones codificantes correspondientes a los mRNA de los genes de interés. Los cebadores incluyen el codón de iniciación de la traducción (AUG) y el codón de terminación (UGA, UAA, UAG). Se añadió al extremo 5' de los cebadores dianas de restricción para realizar ligaciones orientadas en los vectores de expresión mencionados en apartados anteriores. Además, en los cebadores se

incluyó la secuencia de Kozak (CCACC) para asegurar niveles elevados de transcripción [Kozak,1987]. Se han usado la polimerasa Phusion (F531L, Thermo), dada su baja tasa de error.

Para la ejecución de la reacción de PCR:

1. Descongelar a temperatura ambiente las soluciones de 2x Master Mix Phusion, de oligonucleótidos y de DNA y colocarlas en hielo.
2. Pipetear, en un tubo de PCR colocado en una caja con hielo, los siguientes componentes en el orden indicado:
  - 0,5µL de oligonucleótido Forward (10µM)
  - 0,5µL de oligonucleótido Reverse (10µM)
  - 2µL de DNA molde (a 5 ng/µL)
  - 7µL de agua DEPC
  - 10µL de solución 2x Master Mix Phusion
3. Para el control positivo, preparar una solución igual a la anterior, pero utilizando oligonucleótidos y un ADN molde previamente utilizados que se sepa que den lugar correctamente a amplificación. La temperatura de *annealing* los oligonucleótidos del control positivo debería ser inferior a 5°C a la de los oligonucleótidos de la amplificación de interés.
4. Para el control negativo (sirve para comprobar que la solución de oligonucleótidos no contiene contaminación de DNA), pipetear, en otro tubo:
  - 0,5µL de oligonucleótido Forward (10µM)
  - 0,5µL de oligonucleótido Reverse (10µM)
  - 2µL de DNA molde (a 5 ng/µL)
  - 9,5µL de agua DEPC
5. Colocar dentro del termociclador los tubos que contienen los reactivos de PCR.
6. Poner en marcha el termociclador i5 y seleccionar el protocolo correspondiente (Ver tabla siguiente)

Repeticiones de ciclos	Etapas	Tiempos	Temperatura
1x	Desnaturalización	10 segundos	98°C
30x	Desnaturalización	1 segundo	98°C
	<i>Annealing</i>	5 segundos	Temperatura en función de los <i>primers</i> , en general entre 45 y 65°C
	Elongación	15 s/kb del fragmento amplificado	72°C
1x	Elongación	1 minuto	72°C
1x	Preservación	Infinito	4°C

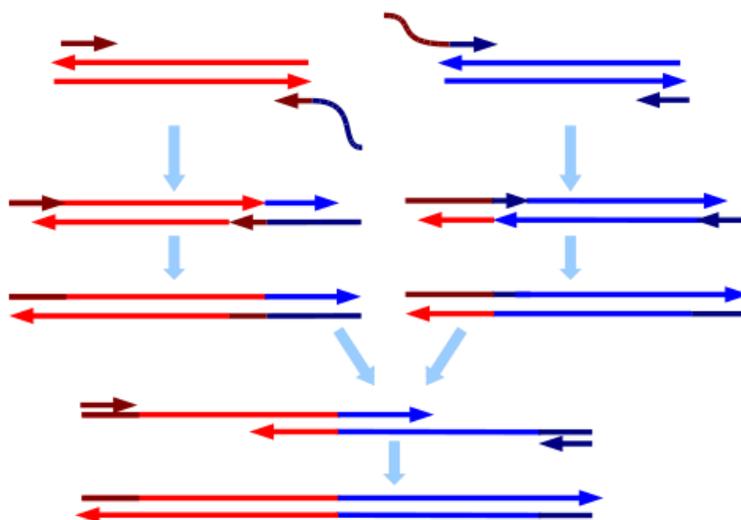
- Una vez terminada la reacción de PCR, las muestras se pueden analizar mediante un gel de electroforesis o bien congelar a -20°C para posteriores tratamientos.

#### 9.8.6.1 Unión de fragmentos de DNA mediante PCR solapante (SOE-PCR)

Esta variante de la técnica de PCR permite el soldado (*Splicing-by-Overlap*) de fragmentos de DNA usando 2 parejas de oligonucleótidos con solapamiento parcial en sus secuencias.

Para cada una de las moléculas a unir, se diseñan dos parejas de *primers*. El primer *reverse* de la secuencia que vaya en el extremo 5' debe tener una zona homologa con el primer *forward* para la secuencia que llevará el extremo 3', como se observa en la Fig 9.17.

Los ciclos y temperaturas son las mismas que en una PCR convencional, exceptuando que se realiza en dos pasos: En primer lugar, se realizan las dos reacciones separadas y, posteriormente, se unen en un mismo tubo 1µL de cada reacción y se incuban durante 15 ciclos, usando una T<sup>a</sup> de *annealing* de 60°C. Una vez terminados los ciclos, se añaden los dos oligonucleótidos más extremos



**Figura 9.17. Esquema de la PCR solapante, mostrando las dos PCR separadas realizadas con oligos solapados, que posteriormente se unen en un solo tubo para dar lugar a un fragmento único.**

(*Forward 1 y reverse 2*) y se continua la PCR por 15-20 ciclos más. EL resultado final es un producto de PCR que consta de ambas moléculas de interés solapadas. Durante el presente trabajo se ha usado esta técnica para la construcción de proteínas fusionadas a diferentes péptidos señal.

#### 9.8.6.2 Amplificación por RT-PCR

Esta es una técnica muy sensible que permite determinar la presencia o ausencia de un RNA mensajero (mRNA) concreto en un extracto celular y por lo tanto puede ser utilizada para determinar e incluso cuantificar la expresión de determinados genes. Además, permite la obtención de cDNA sin la necesidad de tener que recurrir a librerías existentes. En el presente trabajo se ha usado para obtener el cDNA codificante para el IFN $\gamma$ .

Los reactivos y la metodología empleada son los indicados por el producto "Titan One Tube RT-PCR System" (1888382, Roche). Este kit utiliza la actividad de la transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV) para la síntesis de la primera cadena de cDNA y una mezcla de *Taq* y *Pwo* polimerasas para su

amplificación. En la reacción de RT-PCR se partió siempre de 5 mg de RNA total:

Procedimiento:

1. Descongelar las soluciones de dNTPs, DTT y RNA a temperatura ambiente y colocarlas en hielo.
2. Pipetear, en un tubo de PCR *RNase-free*:
  - 1  $\mu$ L de solución de dNTPs
  - 2,5  $\mu$ L de DTT
  - 1  $\mu$ L de oligonucleótidos (10  $\mu$ M)
  - 1  $\mu$ L de RNA (a 60 ng/ $\mu$ L)
  - 9.5  $\mu$ L de agua DEPC
3. Para los controles negativos (para comprobar que los oligonucleótidos no contienen ninguna contaminación que cause una amplificación inespecífica) pipetear, en un tubo de PCR *RNase-free*, los siguientes reactivos:
  - 1  $\mu$ L de solución de dNTPs
  - 2.5  $\mu$ L de DTT
  - 1  $\mu$ L de RNA (a 60 ng/ $\mu$ L)
  - 20,5  $\mu$ L de agua DEPC
4. Descongelar las soluciones de Enzyme Mix y de buffer RT-PCR 5X a temperatura ambiente y colocarlas en hielo.
5. Pipetear, en un tubo de PCR *RNase-free*:
  - 10  $\mu$ L de buffer RT-PCR 5X
  - 1  $\mu$ L Enzyme Mix
  - 14  $\mu$ L de agua
6. Pipetear el contenido del tubo que contiene la solución Master Mix 1 al tubo que contiene la solución Master Mix 2.
7. Colocar dentro del termociclador los tubos que contienen los reactivos de PCR.
8. Poner en marcha el termociclador i5 y seleccionar el protocolo correspondiente (Ver tabla siguiente)

Repeticiones de ciclos	Etapas	Tiempos	Temperatura
1x	Desnaturalización	2 minutos	94°C
10x	Desnaturalización	10 segundos	94°C
	<i>Annealing</i>	30 segundos	En función del oligonucleótido generalmente entre 45 y 65°C
	Elongación	En función de la longitud	68°C
25x	Desnaturalización	10 segundos	94°C
	<i>Annealing</i>	30 segundos	En función del oligonucleótido generalmente entre 45 y 65°C
	Elongación	Añadir al tiempo predeterminado 5 segundos por cada ciclo	68°C
1x	Elongación	7 minutos	68°C
1x	Preservación	Infinito	4°C

- Una vez terminada la reacción de PCR, las muestras se pueden analizar mediante un gel de electroforesis o bien congelar a -20°C para posteriores tratamientos.

## 9.8.7 Modificaciones enzimáticas del DNA

### 9.8.7.1 Digestiones con enzimas de restricción.

Las endonucleasas de restricción son enzimas que hidrolizan el DNA bicatenario en lugares específicos según su secuencia. Las enzimas de tipo 2, las más utilizadas, reconocen secuencias de 4 a 6 nucleótidos, normalmente simétricas. Algunas cortan por el eje de simetría dando lugar a moléculas con los extremos romos y otras dejan extremos 5' o 3' protuberantes llamados cohesivos. Normalmente, la mayoría de las enzimas actúan a 37°C, aunque las hay que requieren temperaturas diferentes. El tampón de incubación es específico para cada enzima.

La actividad de las enzimas se mide en unidades de actividad. Una actividad de enzima de restricción se define como la cantidad necesaria para digerir completamente 1 mg de ADN en 60 minutos, en las condiciones recomendadas. El volumen de enzima debe ser inferior a 1/10 parte del volumen final de la

mezcla de reacción, ya que el glicerol presente en el tampón puede llegar a interferir si su concentración es superior al 5%.

Las enzimas se conservan a  $-30^{\circ}\text{C}$  y hay que mantenerlas en hielo durante su utilización. No conviene tenerlas fuera del congelador más tiempo del necesario para coger la alícuota deseada.

En este trabajo se han utilizado enzimas de restricción suministradas por ThermoScientific, del tipo *FastDigest*, que permiten la digestión rápida del DNA (5-10min), compartiendo todas las enzimas el mismo tampón de digestión.

Procedimiento:

1. Añadir (mediante pipeteo) en un tubo de 0,5 mL las siguientes cantidades en el orden indicado (si se necesita más cantidad de DNA para las posteriores etapas, estas cantidades se pueden escalar). Mantener los enzimas en hielo cuando se encuentren fuera del congelador:
  - 2 $\mu\text{L}$  de tampón *FastDigest*.
  - 1 $\mu\text{g}$  de DNA
  - 1 $\mu\text{L}$  de cada enzima de restricción necesario
  - Hasta 20  $\mu\text{L}$  de volumen final con agua DEPC
2. Incubar 20 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  y 20 minutos  $80^{\circ}\text{C}$ , con el fin de inactivar los enzimas de restricción, el termociclador. Se ha de comprobar, previamente, si los enzimas de restricción utilizados se inactivan mediante un choque térmico, mirando la hoja técnica de cada enzima. Si no es el caso, habrá que purificar el inserto con el kit de purificación de PCR GeneJET PCR purificación Kit (K0701 ThermoScientific), como se describe en el apartado 9.7.1.

#### 9.8.7.2 Defosforilacion de DNA

La defosforilación de los extremos 5' del DNA se realiza con el fin de evitar la religación de los plásmidos linealizados con enzimas de restricción. La enzima utilizada para llevar a cabo esta reacción es la fosfatasa alcalina FastAP (EF0654, Thermo) con su correspondiente tampón de defosforilación. Cada 1 $\mu\text{L}$  de

FastAP es capaz de defosforilar 1 µg de DNA en un volumen de 20 µL, con 2 µL de tampón de defosforilación. El tubo conteniendo esta mezcla se incubaba a 37°C durante 5 min y 80°C durante 5 min para realizar la reacción y la inactivación de la fosfatasa.

#### 9.8.7.3 Ligación de fragmentos de DNA

La ligación de fragmentos de ADN es una técnica utilizada para unir insertos en plásmidos, entre otros usos. La enzima utilizada para llevar a cabo esta reacción es la T4 DNA ligasa (Fermentas), que cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre los extremos yuxtapuestos 5'-P y 3'-OH en DNA o RNA bicatenario. Esta enzima requiere de la presencia de ATP para llevar a cabo la reacción. El tampón de ligación utilizado ya incluye la cantidad de ATP necesaria. El cálculo para la cantidad de DNA de inserto a añadir se realiza según la siguiente expresión:

$$ng \text{ de inserto} = ng \text{ vector} \cdot \frac{\text{longitud DNA inserto (pb)}}{\text{longitud DNA vector (pb)}} \times \text{Relacion molar Inserto: Vector}$$

Procedimiento:

1. Añadir, en un tubo de PCR *RNase-free* de 0.2 mL, las siguientes cantidades:
  - X µL de vector (el volumen que corresponda a 30 ng de vector, hasta un máximo de 4 µL)
  - X µL de DNA a insertar, que contengan una cantidad de DNA en una relación molar de 3:1 (Para ligaciones con extremos cohesivos) o 1:1 (Para extremos romos) respecto a la cantidad de ADN (30 ng) del vector (cálculo a ecuación), hasta un máximo de 2 µL
  - 1 µL de T4 DNA ligasa
  - 2 µL de búfer de ligación 10X
  - X µL de agua DEPC, para tener un volumen total de 20 µL
2. Como control negativo, para descartar posibles religaciones del vector, hay que preparar una ligación en las mismas condiciones, sustituyendo el inserto por más agua DEPC.

3. Mantener a temperatura ambiente (22°C) durante 120 minutos, alternativamente se puede incubar 16h a 4°C.
4. Proceder a la transformación (9.7.8.1) o bien conservar a -20°C.

### **9.8.8. Introducción de material genético en organismos.**

Se puede dividir según se introduzca material genético en bacteria (Transformación) o en células animales (Transfección)

#### *9.8.8.1 Transformación de bacterias mediante choque térmico.*

El proceso de transformación consiste en la incorporación de DNA plasmídico exógeno en células competentes de *E.coli* DH5 $\alpha$  (12297016, Thermo).

1. Descongelar las células competentes manteniendo en hielo del tubo que las contiene. Recordar descongelar 3 tubos más para los controles.
2. Una vez descongeladas, mantener el tubo que contiene las células en hielo durante 10 minutos.
3. Añadir 10 $\mu$ L de la mezcla de ligación o hasta 100ng de plásmido circular a la suspensión de células. Incluir un control añadiendo agua DEPC y otro control para la ligación sin inserto (En el caso de estar realizando una ligación).
4. Mantener los tubos 10 minutos en hielo.
5. Transferir los tubos al termociclador a 42°C e incubar durante 60 segundos. Es fundamental incubar exactamente este tiempo, controlar mediante el cronómetro del termociclador.
6. Transferir los tubos a un vaso con hielo y mantenerlos 1-2 minutos.
7. Añadir 390 $\mu$ L de medio LB estéril a cada tubo e incubar a 37°C al termociclador durante 45 minutos. Esto permite a las bacterias expresar la resistencia al antibiótico (codificada en el plásmido con el que se transforman) que luego se encontrarán en la placa. Invertir cuidadosamente los tubos 2 o 3 veces durante la incubación.
8. Sembrar 200 $\mu$ L de cada tubo en una placa LB+Ampicilina mediante el asa de Digralsky.
9. Incubar las placas invertidas 16h a 37°C, para minimizar la evaporación.

#### 9.8.8.2 Transfección de células animales mediante lipofección

La lipofección (o transfección de liposomas) es una técnica utilizada para inyectar material genético en una célula por medio de liposomas, que son vesículas que pueden fusionarse fácilmente con la membrana celular, ya que ambas están formadas por una bicapa de fosfolípidos. La lipofección generalmente usa un lípido cargado positivamente para formar un agregado con el material genético cargado negativamente (aniónico). Las células toman el complejo formado mediante endocitosis. Durante el presente trabajo se ha usado el sistema K2 *Transfection kit* (Biontex), que cuenta con el reactivo K2 *Transfection* para formar los complejos lipídicos y con el reactor K2 *Multiplier*, que se añade antes de la transfección para detener los procesos de secreción de la célula y mejorar la eficiencia del proceso. El protocolo usado durante el presente trabajo proporciona eficiencias de transfección de entre el 50 y el 80% en células HEK293:

1. Se toman  $1 \times 10^6$  células a partir de un cultivo líquido para cada transfección que se quiera realizar. Recordar incluir un control positivo usando el vector pCMV\_eGFP\_IRES<sub>puro</sub>, que permitirá calcular eficiencia de transfección y, además, la eficacia de la selección mediante puromicina (Eficiencia de selección).
2. Se centrifugan (5min, 800g), y lavan una vez con 900µL de medio SFM4Transfex
3. Se resuspenden en 900µL de medio frescos. La suspensión celular así obtenida se dispensa homogéneamente en cada pocillo en una placa de 12 pocillos.
4. Se agregan 20µL de K2 *multiplier* y se homogeniza la placa suavemente.
5. Incubar por 2h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% Humedad.
6. Mientras tanto, se preparan las soluciones de transfección mezclando:
  - 1µg de DNA plasmídico.
  - 100µL de medio SFM4Transfex.
  - 4µL de reactivo de transfección K2.
7. Homogeneizar por pipeteo utilizando puntas de filtro estériles y sin DNasas.
8. Incubar la mezcla durante 20 minutos.

9. Añadir la mezcla al pocillo con las células.
10. Incubar 24h. Verificar la eficiencia de transfección mediante microscopia de fluorescencia o citometría de flujo (Ver 9.5.3 y 9.5.4).

## 9.9 Otros métodos

### 9.9.1 Cálculo del número de copias de un transgen mediante PCR cuantitativa.

Para determinar el número de copias del gen de interés integradas en el genoma de una línea celular determinada, se ha usado la técnica de PCR cuantitativa. Esta técnica es una variante de la PCR convencional en la cual se añade a la mezcla de PCR un agente fluorescente (SYBR Green) que se intercala en el DNA de doble cadena y produce fluorescencia en función de la cantidad de DNA bicatenario que se forme durante la reacción. Con un termociclador dotado de una cámara capaz de captar la fluorescencia (iQ5, Biorad) y un software que interprete los datos, se puede captar la subida de fluorescencia en cada ciclo y, por tanto, determinar la cantidad de DNA inicial a partir de un patrón con una cantidad de copias conocidas.

Durante el trabajo de tesis, se han construido las rectas patrón usando los mismos vectores usados para la transfección de las líneas celulares, linealizados con una enzima de restricción para evitar diferencias en la eficiencia de la PCR debidas al superenrollamiento de los plásmidos. Dado que cada vector contiene una sola copia del gen de interés y que el tamaño del vector es conocido, resulta sencillo calcular el nº de copias de una solución de concentración conocida:

$$N^{\circ} \text{ copias} = \frac{ng \text{ plásmido} / N_A}{pb \text{ plásmido} * (ng/g) * 650 \frac{g}{mol}}$$

Normalmente, se establece un patrón superior de 300.000 copias totales y se realizan diluciones logarítmicas del mismo, hasta 3 copias. Se incluye también un control negativo. Tanto las muestras como los estándares se realizan por triplicado o cuadruplicado.

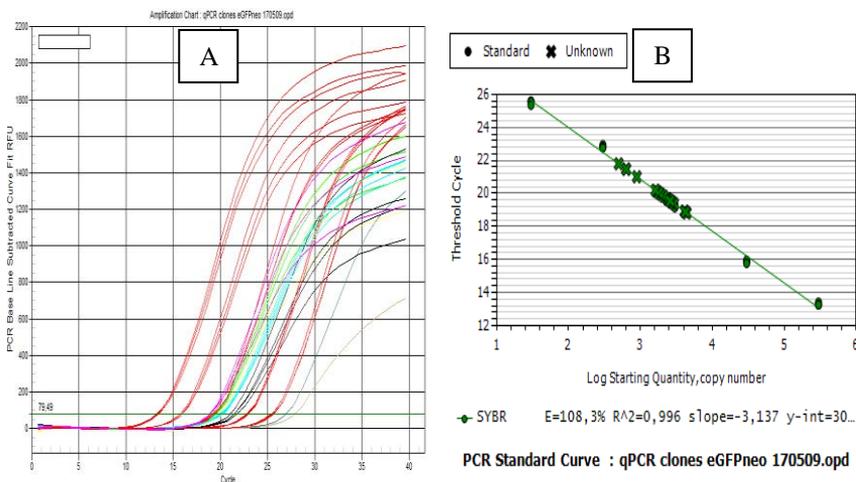
Las reacciones de PCR se preparan en una placa de 96 pocillos para qPCR, sellada con una lámina óptica (2239441, Biorad). En cada pocillo se dispensan:

- 1µL de *primers*
- 9µL de muestra o estándar
- 10µL de iQ Supermix SYBR qPCR kit (170-8862, Biorad)

Se usa el siguiente programa en el termociclador:

Repeticiones de ciclos	Etapas	Tiempos	Temperatura
1x	Desnaturalización	3 minutos	95°C
40x	Desnaturalización	10 segundos	95°C
	Annealing, Elongación y detección.	30 segundos	60°C

Al final, se obtendrá una curva de amplificación como la mostrada en la figura 9.17A. A partir de la misma, se construye una recta de calibrado, y el programa determinará la pendiente de la misma y la eficiencia de la reacción (Fig. 9.17B). Esta ha de estar entre estar comprendida entre el 90-110% para que el experimento pueda considerarse válido



**Figura 9.17.** Curvas de amplificación de peGFP\_IRESneo, en rojo los patrones y en colores las muestras desconocidas (A). Curva de calibrado y valores de eficiencia calculados por el software iQ5 2.1 (Biorad)

Una vez interpolados los valores, el programa da los datos acerca del número de copias iniciales del gen que había en la muestra. Para calcular el nº de copias del gen que cada célula tiene integrada, se usa la siguiente expresión, asumiendo que el tamaño de un genoma de HEK293 es de aprox.  $10,2 \cdot 10^9$  pb (Genoma triploide), correspondiente a una masa de 9,9pg por genoma:

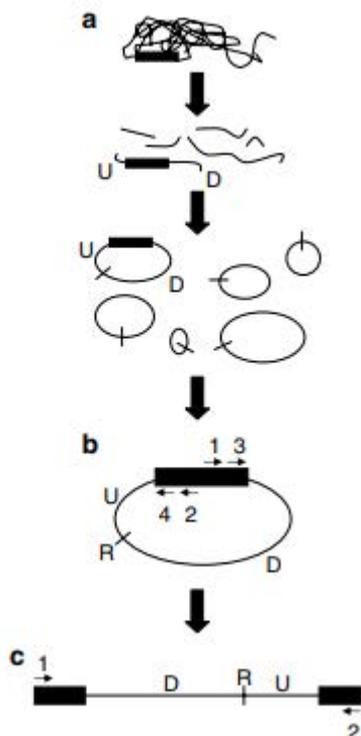
$$\text{Copias/genoma} = \frac{N^{\circ} \text{ copias muestra}}{\text{pg gDNA muestra} / 9,9}$$

### **9.9.2 Determinación del punto de integración de un transgen mediante PCR inversa.**

Existen diversas técnicas que permiten definir en que zona del genoma se ha insertado una determinada secuencia, siendo las más utilizadas Southern-Blot o, actualmente, la secuenciación masiva del genoma mediante NGS (*Next generation sequencing*), que permiten determinar con mucha precisión los puntos de inserción de una o varias secuencias, especialmente, en el caso de la secuenciación masiva.

En el presente trabajo, no obstante, solo se ha determinado el punto de integración en líneas celulares que contienen una sola copia del gen de interés. Para ello se ha usado un método de PCR inversa descrito por Pavlopoulos<sup>5</sup>. La técnica (Fig. 9.18) se basa en la digestión del gDNA de la línea a caracterizar con una o varias enzimas de restricción que no corten dentro del vector integrado, para, posteriormente, realizar una ligación de los fragmentos (a). Usando *primers* que hibridan en las zonas conocidas (b), puede obtener un producto de PCR que contenga parte de las zonas que flanquean al vector integrado (c). Una vez enviado a secuenciar este producto mediante secuenciación Sanger (Servei de Genòmica i Bioinformàtica, UAB) y obtenidas estas secuencias, se puede determinar la zona de integración alineando esta secuencia con la base de datos de genomas humanos de NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

Los resultados se han de confirmar posteriormente mediante la secuenciación directa de la zona del genoma donde hipotéticamente se haya integrado.



**Figura 9.18.** Esquema de PCR inversa para la determinación de las secuencias que flanquean un transgen. U(Upstream), D (Downstream), R (Sitio de restricción).

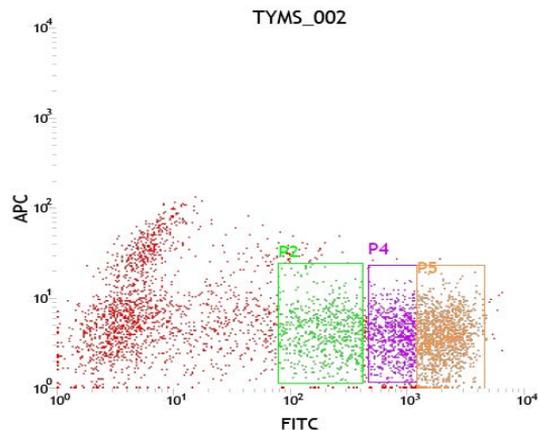
Gráfico extraído de Anastasio Pavlopoulos<sup>5</sup>

### 9.9.3 Edición genómica de líneas celulares mediante CRISPR/Cas9 y aislamiento clonal mediante *Cell-Sorting*

La edición genómica de las líneas se ha llevado a cabo mediante la transfección de los vectores del sistema CRISPR/Cas9 a las células como se describe anteriormente (9.8.8.2). Esta transfección genera una población celular de células no transfectadas y células transfectadas. Dentro de estas últimas, existirán diferentes niveles de fluorescencia, indicativo del nivel de expresión de la nucleasa Cas9 (9.7.1.4). 24 horas después de la transfección, se aíslan clones individuales como sigue:

1. 24h antes del *sorting*, llenar las placas necesarias de 96 pocillos con medio de cultivo para *sorting*, compuesto por:

- 50%: DMEM 10% FBS (p/v)
  - 50%: SFM4Transfex 10% FBS (p/v) acondicionado (Extraído a partir de cultivos celulares de no más de 72h, centrifugado y filtrado a 0,22μm)
2. Incubar la placa 24h a 37°C, 95% Humedad, 5% CO<sub>2</sub>
  3. El *cell sorting* se realiza mediante un separador celular BD FACSJazz en el Servei de Citometria i Anticossos (SCAC). Ha de realizarse en condiciones estériles (Aparato en la cabina de flujo). Es realizado por el personal del Servei. El aparato se configura para sembrar una célula en cada pocillo
  4. Han de aislarse poblaciones separadas según el nivel de fluorescencia



**Figura 9.19. Dotplot de *cell sorting* mostrando diferentes poblaciones, a partir de las que se aislaron clones individuales, separados por su fluorescencia**

(Fig 9.19), ya que, a priori, no se sabe qué nivel de expresión de Cas9 será suficiente para producir la edición deseada. Con un nivel muy bajo puede no realizarse la edición, mientras que un nivel excesivamente alto puede dar lugar a efectos indeseables en otras zonas del genoma (*Off-targets*).

5. Una vez terminado, incubar la placa con los clones a 37°C, 95% Humedad, 5% CO<sub>2</sub> durante aprox. 2-3 semanas. Verificar cada 2-3 días la placa, apuntando como se van desarrollando los clones (Nº células, morfología, etc....)

## 9.10 Referencias

1. Sambrook, J., Rusell, D. W. & Joseph Sambrook, D. W. R. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2344 (2001).
2. Uphoff, C. C. & Drexler, H. G. in *Current Protocols in Molecular Biology* **106**, 28.4.1-28.4.14 (John Wiley & Sons, Inc., 2014).
3. Brezinsky, S. C. . *et al.* A simple method for enriching populations of transfected CHO cells for cells of higher specific productivity. *J. Immunol. Methods* **277**, 141–155 (2003).
4. Saiki, R. K. *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487–91 (1988).
5. Pavlopoulos, A. in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **772**, 267–275 (2012).

# CAPITULO 10

## 10. ANEXOS

### 10.1 ANEXO I: Secuencias de DNA usadas en el presente trabajo

#### Interferón gamma (IFN $\gamma$ ), gb|NC\_000012.12|

```
1 ATGAAATATA CAAGTTATAT CTTGGCTTTT CAGCTCTGCA TCGTTTTGGG
51 TTCTCTTGGC TGTTACTGCC AGGACCCATA TGTAAGAGAA GCAGAAAACC
101 TTAAGAAATA TTTTAATGCA GGTCATTCAG ATGTAGCGGA TAATGGAAC
151 CTTTTCTTAG GCATTTTGAA GAATTGGAAA GAGGAGAGTG ACAGAAAAAT
201 AATGCAGAGC CAAATTGTCT CCTTTTACTT CAAACTTTTT AAAA ACTTTA
251 AAGATGACCA GAGCATCCAA AAGAGTGTGG AGACCATCAA GGAAGACATG
301 AATGTCAAGT TTTTCAATAG CAACAAAAAG AAACGAGATG ACTTCGAAAA
351 GCTGACTAAT TATTGGTAA CTGACTTGAA TGTCCAACGC AAAGCAATAC
401 ATGAACTCAT CCAAGTGATG GCTGAACTGT CGCCAGCAGC TAAAACAGGG
451 AAGCGAAAAA GGAGTCAGAT GCTGTTTCGA GGTCGAAGAG CATCCAGTA
501 A
```

#### Trastuzumab, cadena ligera

```
1 ATGGACATGA GAGTTCCTGC CCAGCTGCTG GGGCTGCTTC TCCTGTGGCT
51 GTCTGGTGCC CGCTGTGACA TCCAGATGAC CCAGAGCCCC TCCTCCCTGA
101 GTGCCAGTGT GGGAGACAGA GTGACCATCA CCTGCAGAGC TTCTCAGGAT
151 GTGAACACAG CTGTGGCCTG GTACCAGCAG AAGCCTGGCA AGGCCCCCAA
201 GCTGTGCATC TACTCTGCCT CCTTCCTGTA CAGTGGTGTG CCCAGCCGCT
251 TCTCTGGAAG CAGAAGTGGC ACAGACTTCA CCCTGACCAT TTCTTCTCTT
301 CAGCCTGAAG ATTTTGCCAC ATACTACTGC CAGCAGCACT ACACCACCCC
351 TCCCACCTTT GGCCAGGGAA CCAAAGTGGA GATCAAGAGG ACTGTGGCTG
401 CTCCTTCTGT CTTTCTCTTC CCACCCAGTG ATGAGCAACT GAAGTCTGGG
451 ACAGCCTCTG TGGTGTGCCT GCTCAACAAC TTCTACCCAA GAGAGCCAA
501 GGTGCAGTGG AAGGTGGACA ATGCCCTGCA GTCTGGCAAC AGCCAGGAGA
551 GCGTGACAGA GCAGGACTCC AAGGACAGCA CCTACAGCCT GAGCAGCACA
601 CTGACTCTCA GCAAGGCTGA CTATGAGAAG CACAGGTCT ATGCCTGTGA
651 GGTGACTCAC CAGGGCTGT CCAGCCAGT CACCAAGAGC TTCAACAGAG
701 GAGAGTGTTA A
```

## Trastuzumab, cadena pesada

1 ATGGACTGGA CCTGGAGATT CCTCTTTGTG GTGGCTGCAG CCACAGGTGT  
51 CCAGAGTGAA GTGCAGCTGG TAGAGTCAGG AGGAGGTCTT GTTCAGCCCG  
101 GTGGCTCCCT GAGGCTCAGC TGTGCTGCTT CTGTTTCAA CATCAAGGAT  
151 ACCTATATCC ACTGGGTCAG GCAGGCTCCT GGCAAAGGCC TGGAAATGGGT  
201 GGCCAGGATC TACCCACCA ACGGCTACAC CAGATATGCT GATTCTGTCA  
251 AGGGCCGCTT CACCATTCTT GCTGACACCT CTAAGAATAC AGCCTACCTG  
301 CAGATGAACA GTCTGAGAGC TGAGGACACT GCAGTGTACT ACTGCAGCCG  
351 CTGGGGTGGA GATGGCTTCT ATGCCATGGA TTACTGGGGC CAGGGCACTC  
401 TGGTFACTGT TTCTTCTGCC AGCACAAGG GTCCAGTGT TTTCCCCTG  
451 GCCCCTAGCA GCAAAGCAC TTCTGGAGGC ACAGCTGCC TGGGCTGTCT  
501 GGTGAAAGAC TACTTCCCAG AACCTGTGAC TGTCTCCTGG AACAGCGGTG  
551 CCTTGACCAG TGGAGTGCAC ACCTTCCCTG CTGTCCCTCA GAGCAGTGGC  
601 CTCTACTCCC TCTCCTCTGT TGTGACAGTC CCTCCTCCA GCCTTGGCAC  
651 CCAGACCTAC ATCTGCAATG TCAATCACAA GCCCAGCAAC ACCAAGGTGG  
701 ATAAGAAGGT TGAGCCACCC AAGTCCGTGTG ACAAACCTCA CACATGTCTT  
751 CCCTGCCCAG CTCCAGAGCT GCTGGGTGGT CCTTCAGTCT TCTTGTCTTCC  
801 TCCAAAGCCT AAGGACACAC TGATGATCAG CAGGACTCCT GAAGTCACCT  
851 GTGTGGTTGT TGATGTGTCT CATGAAGATC CCGAGGTGAA GTTTAACTGG  
901 TATGTGGATG GTGTGGAAGT TCACAATGCC AAAACCAAA CAAGGGAGGA  
951 GCAGTACAAC TCCACATACA GAGTGGTCAG TGTGCTCACA GTGTGCACC  
1001 AGGACTGGCT AACGGCAAG GAGTACAAGT GCAAAGTGTG CAACAAGGCT  
1051 CTGCCTGCCC CCATTGAGAA GACCATCTCC AAGGCCAAGG GACAGCCAAG  
1101 AGAGCCCCAG GTGTATACAC TTCTCCTTC CAGAGATGAG CTCACCAAGA  
1151 ACCAGGTCAG CTTGACCTGC CTGGTCAAAG GATTCTACCC AAGTGACATT  
1201 GCTGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCT GAGAACAACT ACAAACAAC  
1251 TCCACCTGTC CTGGACAGTG ATGGAAGCTT CTTCCTGTAC AGCAAGCTGA  
1301 CTGTGGACAA GAGCAGATGG CAGCAGGGAA ATGTGTCTC CTGCTCTGTG  
1351 ATGCATGAGG CCCTCCACAA CCACTACACA CAGAAGTCAC TGCTCTGAG  
1401 CCCTGGGAAG TGA

## Glutamina sintetasa, gb|XM\_003502861.3|

1 ATGGCCACCT CAGCAAAGTTC CCACTTGAAC AAAAACATCA AGCAAATGTA  
51 CTGTGCCTG CCCCAGGGTG AGAAAGTCCA AGCCATGTAT ATCTGGGTTG  
101 ATGGTACTGG AGAAGGACTG CGCTGCAAAA CCCGACCCCT GACTGTGAG  
151 CCCAAGTGTG TAGAAGAGTT ACCTGAGTGG AATTTTGATG GCTCTAGTAC  
201 CTTTCAGTCT GAGGGCTCCA ACAGTGACAT GTATCTCAGC CCTGTTGCCA  
251 TGTTTCGGGA CCCCTTCCGC AGAGATCCCA ACAAGCTGGT GTTCTGTGAA  
301 GTTTTCAAGT ACAACCGGAA GCCTGCAGAG ACCAATTTAA GGCCTCGTG  
351 TAAACGGATA ATGGACATGG TGAGCAACCA GCACCCCTGG TTTGGAATGG  
401 AACAGGAGTA TACTCTGATG GGAACAGATG GGCACCCTTT TGTTGGCCT  
451 TCCAATGGCT TTCTGGGCC CCAAGGTCCG TATTACTGTG GTGTGGGCGC  
501 AGACAAAGCC TATGGCAGGG ATATCGTGGA GGCTCACTAC CGCGCTGCT  
551 TGTATGCTGG GGTCAAGATT ACAGGAACAA ATGCTGAGGT CATGCCCTGCC  
601 CAGTGGGAAT TCCAAATAGG ACCCTGTGAA GGAATCCGCA TGGGAGATCA  
651 TCTCTGGGTG GCCCGTTTCA TCTTGCATCG AGTATGTGAA GACTTTGGGG  
701 TAATAGCAAC CTTTGACCCC AAGCCATTC CTGGGAACTG GAATGGTGCA  
751 GGCTGCCATA CCAACTTTAG CACCAAGGCC ATGCGGGAGG AGAATGGTCT  
801 GAAGCACATC GAGGAGGCCA TCGAAGAACT AAGCAAGCGG CACCGGTACC

851 ACATTGAGC CTACGATCCC AAGGGGGGCC TGGACAATGC CCGTCGTCTG  
 901 ACTGGGTTC ACGAAACGTC CAACATCAAC GACTTTTCTG CTGGTGTGCG  
 951 CAATCGCAGT GCCAGCATCC GCATTCCCCG GACTGTGCGC CAGGAGAAGA  
 1001 AAGTTACTT TGAAGACCGC CGCCCCTCTG CCAATTGTGA CCCCTTTGCA  
 1051 GTGACAGAAG CCATCGTCCG CACATGCCTT CTCAATGAGA CTGGCGACGA  
 1101 GCCCTTCCAA TACAAAAACT AA

**Fenilalanina hidroxilasa, gb|U49897.1|**

1 ATGTCCACTG CGGTCCTGGA AAACCCAGGC TTGGGCAGGA AACTCTCTGA  
 51 CTTTGGACAG GAAACAAGCT ATATTGAAGA CAACTGCAAT CAAAATGGTG  
 101 CCATATCACT GATCTTCTCA CTCAAAGAAG AAGTTGGTGC ATTGGCCAAA  
 151 GTATTGCGCT TATTTGAGGA GAATGATGTA AACCTGACCC ACATTGAATC  
 201 TAGACCTTCT CGTTTAAAGA AAGATGAGTA TGAATTTTTT ACCCATTTGG  
 251 ATAAACGTAG CCTGCCTGCT CTGACAAACA TCATCAAGAT CTTGAGGCAT  
 301 GACATTGGTG CCACTGTCCA TGAGCTTTCA CGAGATAAGA AGAAAGACAC  
 351 AGTGCCCTGG TTCCAAGAA CCATCAAGA GCTGGACAGA TTTGCCAATC  
 401 AGATTCTCAG CTATGGAGCG GAACTGGATG CTGACCACCC TGGTTTTAAA  
 451 GATCCTGTGT ACCGTGCAAG ACGGAAGCAG TTTGCTGACA TTGCCTACAA  
 501 CTACCGCCAT GGGCAGCCCA TCCCTCGAGT GGAATACATG GAGGAAGAAA  
 551 AGAAAACATG GGGCACAGTG TTCAAGACTC TGAAGTCTT GTATAAAACC  
 601 CATGCTTGCT ATGAGTACAA TCACATTTTT CCACTTCTTG AAAAGTACTG  
 651 TGGCTTCCAT GAAGATAACA TTCCCAGCT GGAAGACGTT TCTCAATTCC  
 701 TGCAGACTTG CACTGGTTTC CGCCTCCGAC CTGTGGCTGG CCTGCTTTC  
 751 TCTCGGGATT TCTTGGGTGG CCTGGCCTTC CGAGTCTTCC ACTGCACACA  
 801 GTACATCAGA CATGGATCCA AGCCCATGTA TACCCCGAA CCTGACATCT  
 851 GCCATGCACT GTTGGGACAT GTGCCCTTGT TTTCAGATCG CAGTTTGCC  
 901 CAGTTTTCCC AGGAAATTGG CCTTGCCTCT CTGGGTGCAC CTGATGAATA  
 951 CATTGAAAAG CTCGCCACAA TTTACTGGTT TACTGTGGAG TTTGGGCTCT  
 1001 GCAAACAAGG AGACTCCATA AAGGCATATG GTGTGGGCT CCTGTCATCC  
 1051 TTTGGTGAAT TACAGTACTG CTTATCAGAG AAGCCAAAGC TTCTCCCCT  
 1101 GGAGCTGGAG AAGACAGCCA TCCAAAATTA CACTGTCACG GAGTTCACG  
 1151 CCCTGTATTA CGTGGCAGAG AGTTTAAATG ATGCCAAGGA GAAAGTAAGG  
 1201 AACTTTGCTG CCACAATACC TCGGCCCTTC TCAGTTCGCT ACGACCCATA  
 1251 CACCCAAAGG ATTTGAGGTCT TGGACAATAC CCAGCAGCTT AAGATTTTGG  
 1301 CTGATTCCAT TAACAGTGAA ATTTGGAATCC TTTGCAGTGC CCTCCAGAAA  
 1351 ATAAAGTAA

**Timidilato sintetasa, gb|NM\_001354867.1|**

1 ATGCCTGTGG CCGGCTCGGA GCTGCCGCGC CGGCCCTTGC CCCC GCCCGC  
 51 ACAGGAGCGG GACGCCGAGC CGCGTCCGCC GCACGGGGAG CTGCAGTACC  
 101 TGGGGCAGAT CCAACACATC CTCCGCTGCG GCGTCAGGAA GGACGACCGC  
 151 ACGGGCACC GACCCCTGTC GGTATTCGGC ATGCAGGCGC GCTACAGCCT  
 201 GAGAGATGAA TTCCCTCTGC TGACAACCAA ACGTGTGTTC TGGAAAGGGTG  
 251 TTTTGGAGGA GTTGTGTGG TTTATCAAGG GATCCACAAA TCGTAAAGAG  
 301 CTGTCTTCCA AGGGAGTGAA AATCTGGGAT GCCAATGGAT CCCGAGACTT  
 351 TTTGGACAGC CTGGGATTCT CCACCAGAGA AGAAGGGGAC TTGGGCCAG  
 401 TTTATGGCTT CCAGTGAGG CATTTTGGGG CAGAATACAG AGATATGGAA

451 TCAGATTATT CAGGACAGGG AGTTGACCAA CTGCAAAGAG TGATTGACAC  
 501 CATCAAAACC AACCTGACG ACAGAAGAAT CATCATGTGC GCTTGAATC  
 551 CAAGAGATCT TCCTCTGATG GCGCTGCCTC CATGCCATGC CCTCTGCCAG  
 601 TTCTATGTGG TGAACAGTGA GCTGTCCTGC CAGCTGTACC AGAGATCGGG  
 651 AGACATGGGC CTCGGTGTGC CTTTCAACAT CGCCAGTAC GCCCTGCTCA  
 701 CGTACATGAT TGCGCACATC ACGGGCCTGA AGCCAGGTGA CTTTATACAC  
 751 ACTTTGGGAG ATGCACATAT TTACCTGAAT CACATCGAGC CACTGAAAAT  
 801 TCAGCTTCAG CGAGAACCCA GACCTTTCCC AAAGCTCAGG ATTCTCGAA  
 851 AAGTTGAGAA AATTGATGAC TTCAAAGCTG AAGACTTTCA GATTGAAGGG  
 901 TACAATCCGC ATCCAACATAT TAAAATGGAA ATGGCTGTTT AG

**Proteína verde fluorescente, eGFP, gb|NM\_001354867.1**

1 ATGGTGAGCA AGGGCGAGGA GCTGTTACC GGGGTGGTGC CCATCTGGT  
 51 CGAGCTGGAC GGCGACGTAA ACGGCCACAA GTTCAGCGTG TCCGGCGAGG  
 101 GCGAGGGCGA TGCCACCTAC GGCAAGCTGA CCCTGAAGTT CATCTGCACC  
 151 ACCGGCAAGC TGCCCGTGCC CTGGCCACC CTCGTGACCA CCCTGACCTA  
 201 CGGCGTGCAG TGCTTCAGCC GCTACCCCGA CCACATGAAG CAGCAGCACT  
 251 TCTTCAAGTC CGCCATGCCC GAAGGCTACG TCCAGGAGCG CACCATCTTC  
 301 TTCAAGGACG ACGGCAACTA CAAGACCCGC GCCGAGGTGA AGTTCGAGGG  
 351 CGACACCCTG GTGAACCGCA TCGAGCTGAA GGGCATCGAC TTCAAGGAGG  
 401 ACGGCAACAT CCTGGGGCAC AAGCTGGAGT ACAACTACAA CAGCCACAAC  
 451 GTCTATATCA TGGCCGACAA GCAGAAGAAC GGCATCAAGG TGAACTTCAA  
 501 GATCCGCCAC AACATCGAGG ACGGCAGCGT GCAGCTCGCC GACCACTACC  
 551 AGCAGAACAC CCCCATCGGC GACGGCCCCG TGCTGTGTC CGACAACCAC  
 601 TACCTGAGCA CCCAGTCCGC CCTGAGCAAA GACCCCAACG AGAAGCGCGA  
 651 TCACATGGTC CTGCTGGAGT TCGTGACCGC CGCCGGGATC ACTCTCGGCA  
 701 TGGACGAGCT GTACAAGTAA

## 10.2 ANEXO II. Oligonucleótidos usados en el presente trabajo

### *Amplificación IFN $\gamma$*

<b>Fw</b>	<b>NheI</b>	<b>GCGGCGCTAGCATGAAATATACAAGTTATATCTTG</b>
<b>Rv</b>	<b>EcoRI</b>	<b>GCTGGAATTCTTACTGGGATGCTCTTCG</b>

### *PCR solapante eGFP:IFN $\alpha$ 2\_SP*

<b>IFN<math>\alpha</math>2 SP Fw</b>	<b>GATAGCTAGCATGGCCTTGACCTTT</b>
<b>eGFP_EcoRI Rv</b>	<b>ACTGGAATTCTTACTTGTACAGCTCG</b>
<b>IFNSP:eGFP Fw</b>	<b>AGTCAAGCTGCTCTGTGGGCATGGTGAGCAAGGGCGAG</b>
<b>IFNSP:eGFP Rv</b>	<b>CTCGCCCTTGCTCACCATGCCACAGAGCAGCTTGACT</b>

### *Amplificación de promotores*

<b>CAG Fw</b>	<b>GCGACGGCTCTAGTTATTAATAGTAATC</b>
<b>CAG Rv</b>	<b>CGACAGATATCGTATATCTCCTTTGATTG</b>
<b>EF-1A Fw</b>	<b>TTAACGCGTGTGCGACGATAAGC</b>
<b>EF-1A Rv</b>	<b>ATCGTGATATCTGTCGAAATTCCTCAC</b>

### *Amplificación de marcadores de selección*

<b>GLUL Fw</b>	<b>CACAACGAGACGATGGCCACCTCAG</b>
<b>GLUL Rv</b>	<b>CAGCTCTAGATTAGTTTTTGTATTGGAAG</b>

*qPCR*

<b>β-actina Fw</b>	<b>GAGCCTCGCCTTTGCCGATC</b>
<b>β-actina Rv</b>	<b>ACGAGCGCGGCGATATCA</b>
<b>eGFP Fw</b>	<b>ACGTAAACGGCCACAAGTTC</b>
<b>eGFP Rv</b>	<b>AAGTCGTGCTGCTTCATGTG</b>
<b>Puro Fw</b>	<b>GACCGAGTACAAGCCCACG</b>
<b>Puro Rv</b>	<b>GACCCACACCTTGCCGATG</b>

*PCR+Secuenciación*

<b>iPCR Fw</b>	<b>CCTTCTATCGCCTTCTTGAC</b>
<b>iPCR Rv</b>	<b>ATGGGCTATGAACTAATGACC</b>
<b>Chr6 Junct. Fw</b>	<b>TCAGCCAGTGAACCTAACATCT G</b>
<b>Chr6 Junct. Rv</b>	<b>TTGGAGCGAACGACCTACAC</b>
<b>CRISPR_Fw</b>	<b>GAACCCACTGCTTACTGGCTTA</b>
<b>CRISPR_Rv_Sense</b>	<b>ATGGGCTATGAACTAATGACC</b>
<b>CRISPR_Rv_Asense</b>	<b>GTTAGGCGTTTTGCGCTGC</b>

*sgRNA CRISPR*

<b>TYMS</b>	<b>TCCAACACATCCTCCGCTG</b>
<b>GLUL</b>	<b>ACGGAAGGGGTCCCGAAACA</b>
<b>Sg30_eGFP</b>	<b>GGCGAGGGCGATGCCACCTA</b>