

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

**Desarrollo de una tecnología de producción
de la enzima alfa Galactosidasa humana
recombinante para uso terapéutico**

Lic. María Celeste Rodríguez

Director de Tesis: Dr. Claudio C. Prieto

Co-directora de Tesis: Dra. Natalia A. Ceaglio

Lugar de realización:

Laboratorio de Cultivos Celulares

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

Universidad Nacional del Litoral

-2017-

AGRADECIMIENTOS

Muchas personas han intervenido y tenido influencia en mi formación tanto académica como personal. Algunas de un modo más directo que otras. Pero todas ellas, han dejado su huella en mí.

En primera instancia quisiera expresar mi agradecimiento a mis directores de beca y tesis Marina Etcheverrigaray, Natalia Ceaglio y Claudio Prieto, por brindarme la posibilidad de realizar mi tesis en el Laboratorio de Cultivos Celulares (LCC) y por guiarme a lo largo de estos años de trabajo. También, a Ricardo Kratje y Marina Etcheverrigaray por permitirme continuar con mi trabajo de formación en el LCC. Asimismo, agradecer a todos mis compañeros de laboratorio y oficina, por su ayuda durante la realización de este trabajo y por brindarme su compañerismo. Agradecer especialmente a Belén Tardivo, Sebastián Antuña y Alejandro Raimondi, por su estrecha colaboración durante el desarrollo de la tesis, y a mis compañeros del área de *Purificación* y de *Control de Calidad*, por brindarme todo su conocimiento y ayuda en los momentos necesarios.

Un agradecimiento especial a Nilda Marsili y a los integrantes de la cátedra de QAI.

Quiero agradecer a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (FBCB, UNL), a los responsables de la empresa Zelltek SA. y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

A mis seres más queridos, mi familia, mi novio y amigos, por el apoyo incondicional recibido durante tantos años. Finalmente, a todas aquellas personas que Dios puso en mi camino, quienes me tendieron una mano, un abrazo o me regalaron su sonrisa.

Parte de los resultados de la presente tesis fueron publicados en:

Publicaciones

1. Rodríguez, M. C.; Ceaglio, N.; Antuña, S.; Tardivo, B.; Etcheverrigaray, M.; Prieto, C. (2017) High yield process for the production of active human α -Galactosidase A in CHO-K1 cells through lentivirus transgenesis. *Biotechnology progress*. 33(5); 1334-1345.

Producción tecnológica sin título de la propiedad intelectual

1. Rodríguez, M. C.; Ceaglio, N.; Prieto, C; Etcheverrigaray, M; Kratje, R. Desarrollo de métodos de control de calidad de la rhaGal necesarios para el seguimiento del proceso de producción y del producto final. Tipo de producción tecnológica: proceso de producción. Fecha de creación: 31 de diciembre de 2016.
2. Rodríguez, M. C.; Ceaglio, N.; Prieto, C; Etcheverrigaray, M; Kratje, R. Desarrollo de una tecnología de producción de la enzima rhalfaGal para uso terapéutico. Tipo de producción tecnológica: proceso de producción. Fecha de creación: 31 de diciembre de 2015.

Parte de los resultados de la presente tesis fueron reconocidos con los siguientes premios y/o distinciones:

1. Primer premio sesión “Proceso de recuperación y purificación”. 4^{to} Simposio Argentino de procesos Biotecnológicos (SAPROBIO). “*Producción de la enzima alfa-Galactosidasa A humana en células CHO-K1. Purificación parcial y caracterización bioquímica*”.

Parte de los resultados de la presente tesis fueron publicados en:

- Septiembre 2017.** 13th Protein Expression in Animal Cells Conference (PEACe) conference. Valencia, España. “Lentivirus transgenesis for high yield production of human alpha-Galactosidase A in suspension CHO-K1 cells”. Rodríguez, M. C.; Ceaglio, N.; Antuña, S.; Tardivo, M. B.; Etcheverrigaray, M.; Prieto, C. (Poster).
- Mayo 2017.** 25th European society for animal cell technology (ESACT) meeting. Lausana, Suiza. “High yield process for the production of active human alpha-galactosidase a in suspension CHO k1 cells”. Rodríguez, M. C.; Ceaglio, N.; Etcheverrigaray, M.; Prieto, C. (Poster).
- Diciembre 2016.** 4^{to} Simposio Argentino de procesos Biotecnológicos (SAPROBIO). Ciudad Autónoma de Buenos Aires. “*Producción de la enzima alfa-Galactosidasa A humana en células CHO-K1. Purificación parcial y caracterización bioquímica*”. Rodríguez, M. C.; Ceaglio, N.; Prieto, C.; Etcheverrigaray, M. (Oral y poster).
- Septiembre 2016.** VII Simposio Latinoamericano de Tecnología de Cultivos Celulares (VII SLATCC). Cocoyoc, Morelos, México. “*Producción de la enzima alfa Galactosidasa A humana en medio libre de suero fetal bovino, purificación parcial y caracterización*”. Rodríguez, M. C.; Ceaglio, N.; Prieto, C.; Etcheverrigaray, M. (Poster).
- Agosto 2015.** XII Jornada de Farmacia y Bioquímica Industrial- JORFYBI 2015. III Congreso Latinoamericano de Farmacia y Bioquímica Industrial. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. “*Generación de líneas y clones celulares productores de la enzima alfa Galactosidasa humana recombinante para uso terapéutico*”. Rodríguez, M. C.; Ceaglio, N.; Etcheverrigaray, M.; Kratje, R.; Prieto, C. (Poster).
- Diciembre 2014.** 3^{er} Simposio Argentino de procesos Biotecnológicos (SAPROBIO). Santa Fe. “*Producción de la enzima alfa Galactosidasa humana*”.

recombinante mediante la generación de líneas celulares establecidas". Rodríguez, M. C.; Ceaglio, N.; Etcheverrigaray, M.; Kratje, R.; Prieto, C. (Poster).

Noviembre 2014. VI Simposio Latinoamericano de Tecnología de Cultivos Celulares (VI SLATCC). Valparaíso, Chile. "*Generación de líneas celulares productoras de la enzima alfa Galactosidasa human recombinante*". Rodríguez, M. C.; Ceaglio, N.; Etcheverrigaray, M.; Kratje, R.; Prieto, C. (Oral y poster).

ÍNDICE

| | |
|---|--------------|
| Abreviaturas y símbolos | <i>XIII</i> |
| Unidades | <i>XVIII</i> |
| Resumen | <i>XIX</i> |
| Abstract | <i>XXI</i> |
| Introducción | 1 |
| 1. <i>Expresión de proteínas recombinantes para uso terapéutico</i> | 2 |
| 2. <i>Sistemas de expresión</i> | 3 |
| 2.1. <i>Sistemas Bacterias</i> | 3 |
| 2.2. <i>Levaduras</i> | 3 |
| 2.3. <i>Hongos filamentosos</i> | 4 |
| 2.4. <i>Células de insectos</i> | 4 |
| 2.5. <i>Plantas transgénicas</i> | 5 |
| 2.6. <i>Células de mamíferos</i> | 6 |
| 2.7. <i>Comparación de los distintos sistemas de expresión</i> | 7 |
| 3. <i>Proceso de producción de una proteína recombinante de uso terapéutico en cultivo de células animales</i> | 7 |
| 4. <i>Transferencia del material genético y desarrollo de líneas celulares en cultivos de células animales</i> | 12 |
| 4.1. <i>Amplificación del TG de interés</i> | 13 |
| 4.2. <i>Modificaciones sitio-dirigidas</i> | 14 |
| 4.3. <i>Transferencia de genes mediante el empleo de vectores lentivirales</i> | 16 |
| 5. <i>Glicosilación proteica y calidad del producto</i> | 18 |
| 5.1 <i>Glicosilación. Vía metabólica</i> | 19 |
| 5.2 <i>Factores externos que influyen la glicosilación de proteínas</i> | 22 |
| 6. <i>Aplicación de enzimas como productos biofarmacéuticos</i> | 23 |
| 6.1. <i>Costos y regulación vigente de drogas huérfanas</i> | 24 |
| 7. <i>Enfermedades lisosomales</i> | 26 |
| 8. <i>Síntesis y transporte de enzimas lisosomales</i> | 27 |
| 8.1. <i>Receptores M6P</i> | 29 |
| 9. <i>Enfermedad de Fabry</i> | 31 |
| 9.1. <i>Mecanismo de acción</i> | 31 |
| 9.2. <i>Diagnóstico</i> | 32 |
| 9.3. <i>Tratamiento</i> | 32 |
| 9.3.1. <i>Terapia génica</i> | 32 |

| | | |
|------------|---|----|
| 9.3.2. | <i>Terapia de reducción por sustrato (depleción o privación)</i> | 33 |
| 9.3.3. | <i>Empleo de chaperonas químicas</i> | 34 |
| 9.3.4. | <i>Terapia de Reemplazo Enzimático</i> | 34 |
| 9.3.4.1. | <i>Efectividad de la TRE</i> | 35 |
| 9.3.4.2. | <i>Agalsidasa alfa versus agalsidasa beta</i> | 37 |
| 9.3.4.3. | <i>Alteraciones del sistema inmune en pacientes. Inmunogenicidad de la terapia</i> | 37 |
| 10. | α-Galactosidasa A | 37 |
| 11. | Expresión de α-Galactosidasa A en forma recombinante | 40 |
| 11.1. | <i>Análisis de los N-glicanos de la enzima α-Galactosidasa A recombinante</i> | 42 |
| | Objetivos del trabajo | 43 |
| | Resultados | 45 |
| | <i>Resultados parte 1: Desarrollo de métodos de control de calidad de la rhaGAL necesarios para el seguimiento del proceso de producción y del producto final</i> | 46 |
| 1. | <i>Plan de Inmunización</i> | 47 |
| 2. | <i>Ensayos de cuantificación</i> | 49 |
| 2.1. | <i>Enzimoimmunoensayo (ELISA)</i> | 49 |
| 2.1.1. | <i>Purificación de pAb anti-rhaGAL mediante cromatografía de afinidad a proteína A</i> | 49 |
| 2.1.1.1. | <i>Evaluación del proceso de purificación pAb anti-rhaGAL</i> | 50 |
| 2.1.2. | <i>Conjugación del pAb anti-rhaGAL a biotina</i> | 51 |
| 2.1.3. | <i>Desarrollo de un ensayo de ELISA sándwich</i> | 52 |
| 2.1.4. | <i>Evaluación de diferentes entornos proteicos (efecto matriz)</i> | 55 |
| 2.1.5. | <i>Evaluación de la reproducibilidad intra- e inter-ensayo</i> | 58 |
| 2.2. | <i>Actividad enzimática in vitro</i> | 59 |
| 2.2.1. | <i>Evaluación de diferentes entornos proteicos (efecto matriz)</i> | 60 |
| 2.2.2. | <i>Evaluación de la reproducibilidad intra- e inter-ensayo</i> | 63 |
| 2.2.3. | <i>Determinación de los parámetros cinéticos</i> | 64 |
| 2.2.4. | <i>Optimización del tiempo del ensayo de actividad enzimática in vitro</i> | 65 |
| 2.3. | <i>Determinación de Manosa-6-fosfato (M6P)</i> | 66 |
| 3. | <i>Ensayos de identificación</i> | 69 |
| 3.1. | <i>Inmunocaracterización mediante SDS-PAGE</i> | 69 |
| 3.1.1. | <i>Evaluación del límite de detección del ensayo de SDS-</i> | |

| | | |
|--------|---|-----|
| | <i>PAGE/western blot</i> | 70 |
| 3.2. | <i>Isoelectroenfoque</i> | 70 |
| 4. | Ensayos de valoración de actividad biológica | 71 |
| 5. | ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS | 77 |
| | <i>Resultados parte 2: Generación de líneas y clones celulares recombinantes.</i> | |
| | <i>Cultivo en alta densidad</i> | 78 |
| 1. | Obtención de la secuencia codificante de rhaGAL. Generación de vectores de expresión plasmídicos y lentivirales | 79 |
| 1.1. | <i>Construcción de vectores de expresión productores de rhaGAL</i> | 79 |
| 1.1.1. | <i>Vector de expresión pLV EF1 rhGal F</i> | 79 |
| 1.1.2. | <i>Vector de expresión pZC CMV rhGal F</i> | 80 |
| 2. | Generación de líneas celulares productoras de rhaGAL | 81 |
| 2.1. | <i>Generación de líneas celulares mediante transfección</i> | 81 |
| 2.2. | <i>Generación de líneas celulares mediante transducción</i> | 83 |
| 2.2.1. | <i>Obtención de vectores lentivirales (LVs) codificantes de rhaGAL</i> | 83 |
| 2.2.2. | <i>Determinación del título de LPs</i> | 83 |
| 2.2.3. | <i>Generación de líneas celulares productoras de rhaGAL por transducción con LVs</i> | 84 |
| 3. | Adaptación de la línea CHO_{adh} GAL TD3 300 al crecimiento en suspensión | 88 |
| 4. | Clonado de la línea celular CHO_s GAL TD3 50 | 91 |
| 5. | Caracterización de la línea celular CHO_s GAL TD3 50 y el clon P3G2 | 91 |
| 6. | Producción. Cultivo en biorreactor | 94 |
| 6.1. | <i>Línea CHO_s GAL TD3 50</i> | 94 |
| 6.1.1. | <i>Análisis de número de copias de TG</i> | 95 |
| 6.2. | <i>Clon P3G2</i> | 96 |
| 6.2.1. | <i>Análisis de número de copias de TG</i> | 96 |
| 7. | ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS | 97 |
| | <i>Resultados parte 3: Desarrollo de una metodología de purificación de rhaGAL a partir de sobrenadantes de cultivo</i> | 99 |
| 1. | Desarrollo del primer paso de purificación de rhaGAL | 100 |
| 2. | Desarrollo del segundo paso de purificación de rhaGAL | 112 |
| 3. | Purificación de rhaGAL utilizando las 2 etapas previamente descritas | 123 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| 4. | ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS | 130 |
| | <i>Resultados parte 4: Caracterización de rhaGAL purificada</i> | 133 |
| 1. | Caracterización fisicoquímica | 134 |
| 1.1. | <i>SDS-PAGE e IEF</i> | 134 |
| 1.2. | <i>Espectrofluorimetría</i> | 136 |
| 2. | Caracterización bioquímica | 137 |
| 2.1. | <i>Parámetros cinéticos</i> | 137 |
| 2.2. | <i>Estabilidad en plasma</i> | 138 |
| 3. | Análisis de la glicosilación | 140 |
| 3.1. | <i>Manosa-6-fosfato y ácido siálico</i> | 140 |
| 3.2. | <i>Monosacáridos</i> | 141 |
| 3.3. | <i>Análisis y composición del perfil de N-glicanos</i> | 141 |
| 4. | Ensayo de valoración biológica: ensayo de internalización celular | 145 |
| 5. | ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS- CONCLUSIONES PARCIALES | 149 |
| | Discusión y conclusiones | 150 |
| | Materiales y Métodos | 158 |
| 1. | Plan de Inmunización | 159 |
| 2. | Desarrollo de un método de cuantificación de rhaGAL por ELISA sándwich | 160 |
| 2.1 | <i>Purificación de pAb anti-rhaGAL mediante cromatografía de afinidad a proteína A</i> | 160 |
| 2.1.1. | <i>Evaluación del proceso de purificación</i> | 161 |
| 2.2 | <i>Conjugación de anticuerpos policlonales</i> | 161 |
| 2.3 | <i>ELISA sándwich</i> | 162 |
| 3. | Medición de actividad enzimática in vitro | 163 |
| 3.1. | <i>Curva de adición estándar 4-MU</i> | 163 |
| 4. | Desarrollo de ensayos de identificación | 164 |
| 4.1. | <i>Inmunocaracterización mediante SDS-PAGE</i> | 164 |
| 4.1.1. | <i>Detección mediante coloración con azul brillante de Coomassie</i> | 164 |
| 4.1.2. | <i>Detección inmunoquímica (western blot)</i> | 165 |
| 4.2. | <i>Isoelectroenfoco (IEF)</i> | 166 |
| 4.2.1. | <i>Detección mediante coloración con azul brillante de Coomassie coloidal</i> | 167 |
| 4.2.2. | <i>Detección inmunoquímica (western blot)</i> | 167 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| 5. | <i>Técnicas de biología molecular</i> | 167 |
| 5.1. | <i>Líneas celulares procariotas</i> | 167 |
| 5.2. | <i>Medios de cultivo para células procariotas</i> | 167 |
| 5.3. | <i>Purificación de ADN plasmídico</i> | 168 |
| 5.3.1. | <i>Minipreparación de ADN plasmídico</i> | 168 |
| 5.3.2. | <i>Maxipreparación de ADN plasmídico</i> | 169 |
| 5.4. | <i>Determinación de la concentración y pureza del ADN</i> | 170 |
| 5.5. | <i>Digestiones enzimáticas</i> | 171 |
| 5.6. | <i>Electroforesis de ADN en geles de agarosa</i> | 171 |
| 5.7. | <i>Precipitación de ADN</i> | 172 |
| 5.8. | <i>Purificación de ADN a partir de geles de agarosa</i> | 172 |
| 5.9. | <i>Reacciones de ligación de ADN</i> | 173 |
| 5.10. | <i>Preparación de células E. coli TOP 10 competentes, por el método químico</i> | 173 |
| 5.11. | <i>Transformación de células competentes</i> | 174 |
| 5.12. | <i>Revitalización de cepas bacterianas</i> | 174 |
| 6. | <i>Técnicas de cultivo celular</i> | 174 |
| 6.1. | <i>Líneas celulares</i> | 174 |
| 6.1.1. | <i>CHO-K1 (ATCC)</i> | 174 |
| 6.1.2. | <i>HEK293T/17 (ATCC, CRL-11268)</i> | 174 |
| 6.1.3. | <i>Fibroblastos derivados de pacientes con la enfermedad de Fabry (NIGMS Coriell Institute, USA)</i> | 175 |
| 6.2. | <i>Medios de cultivo y suplementos para células animales</i> | 175 |
| 6.2.1. | <i>CHO-K1adh</i> | 175 |
| 6.2.2. | <i>CHO-K1s</i> | 175 |
| 6.2.3. | <i>HEK293T/17 adherentes</i> | 175 |
| 6.2.4. | <i>Fibroblastos de pacientes con la enfermedad de Fabry</i> | 175 |
| 6.2.5. | <i>Suero fetal bovino</i> | 175 |
| 6.2.6. | <i>Tripsina</i> | 176 |
| 6.3. | <i>Sistemas de cultivos de células</i> | 176 |
| 6.3.1. | <i>Cultivos en adherencia</i> | 176 |
| 6.3.2. | <i>Cultivos en suspensión en pequeña escala</i> | 176 |
| 6.3.3. | <i>Cultivos en biorreactor tanque agitado de 1 l (BIOSTAT Qplus, Sartorius)</i> | 176 |
| 6.4. | <i>Determinaciones analíticas en cultivos celulares</i> | 177 |
| 6.4.1. | <i>Determinación de la concentración y viabilidad de células</i> | 177 |

| | | |
|-----------|--|-----|
| 6.4.2. | <i>Monitoreo del consumo de glucosa y de la producción de lactato y amonio en sobrenadantes de cultivo</i> | 177 |
| 6.4.3. | <i>Estimación de parámetros cinéticos de cultivo</i> | 180 |
| 6.5. | <i>Criopreservación de líneas celulares de mamífero</i> | 181 |
| 6.6. | <i>Revitalización de líneas celulares de mamífero</i> | 181 |
| 6.7. | <i>Desarrollo de líneas celulares recombinantes</i> | 182 |
| 6.7.1. | <i>Transfección mediante lipofección</i> | 182 |
| 6.7.2. | <i>Transducción</i> | 183 |
| 6.7.2.1. | <i>Obtención de vectores lentivirales (LVs) codificantes de rhaGAL</i> | 183 |
| 6.7.2.2. | <i>Concentración de LVs mediante ultracentrifugación</i> | 183 |
| 6.7.2.3. | <i>Determinación del título de LPs</i> | 184 |
| 6.7.2.4. | <i>Transducción lentiviral</i> | 186 |
| 6.8. | <i>Generación de líneas celulares estables</i> | 187 |
| 6.9. | <i>Adaptación de células a su crecimiento en suspensión con medios de cultivo libres de SFB</i> | 188 |
| 6.10. | <i>Obtención de clones celulares</i> | 189 |
| 6.11. | <i>Determinación de la productividad celular mediante ELISA sándwich y actividad enzimática in vitro</i> | 190 |
| 6.12. | <i>Determinación de secuencias codificantes de LVs</i> | 190 |
| 6.12.1. | <i>Análisis de la presencia/ausencia de secuencias codificantes de proteínas lentivirales en el genoma de la célula productora</i> | 190 |
| 6.12.2. | <i>Análisis del número de copias del TG en el genoma</i> | 192 |
| 7. | <i>Purificación</i> | 194 |
| 7.1. | <i>Cromatografía IEX</i> | 194 |
| 7.2. | <i>Cromatografía HIC</i> | 195 |
| 7.3. | <i>Cromatografía en fase reversa</i> | 195 |
| 7.4. | <i>Espectrofotometría</i> | 196 |
| 7.5. | <i>Método de Bradford. Cuantificación de proteínas totales</i> | 196 |
| 8. | <i>Métodos de caracterización enzima pura</i> | 197 |
| 8.1. | <i>Caracterización fisicoquímica</i> | 197 |
| 8.1.1. | <i>SDS-PAGE e IEF</i> | 197 |
| 8.1.2. | <i>Espectrofluorimetría</i> | 197 |
| 8.2. | <i>Caracterización bioquímica</i> | 197 |
| 8.2.1. | <i>Actividad específica in vitro</i> | 197 |
| 8.2.2. | <i>Estabilidad en plasma</i> | 197 |
| 8.2.3. | <i>Parámetros cinéticos</i> | 198 |

| | | |
|------------|---|-----|
| 8.3. | <i>Análisis de glicosilación</i> | 198 |
| 8.3.1. | <i>Composición de monosacáridos</i> | 198 |
| 8.3.2. | <i>Cuantificación de ácido siálico (Neu5Ac y Neu5Gc) y M6P</i> | 199 |
| 8.3.3. | <i>Análisis y composición del perfil de N-glicanos</i> | 199 |
| 8.3.3.1. | <i>N-deglicosilación enzimática</i> | 199 |
| 8.3.3.2. | <i>Marcación de los N-glicanos con el fluoróforo 2-AB</i> | 200 |
| 8.3.3.3. | <i>Cromatografía de intercambio aniónico débil (WAX) de los glicanos marcados</i> | 200 |
| 9. | <i>Ensayo de valoración de la actividad biológica: internalización por células</i> | 201 |
| 9.1. | <i>Microscopía de fluorescencia</i> | 202 |
| 10. | <i>Análisis estadístico</i> | 202 |
| | Bibliografía | 203 |

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

| | |
|---------------------|--|
| 4-MU | 4-metilumbeliferona |
| 4-MU- α -Gal | 4-metilumbeliferil- α -D-galactopiranosido |
| 6-APA | 6-aminopenicilánico |
| rh α GAL | enzima alfa Galactosidasa humana recombinante |
| ADN | ácido desoxirribonucleico |
| ADNc | ADN copia |
| ALP | fosfatasa alcalina |
| ANMAT | Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica |
| ANOVA | análisis de la varianza |
| ASB | Albúmina sérica bovina |
| ASGPR | receptor de asialo-glicoproteínas |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| ATF | filtración por flujo alternado |
| ARN | ácido reboxirribonucleico |
| BHK21 | células de riñón de hámster bebé |
| CD | concentración obtenida |
| Cél. | células |
| CHO | células de ovario de hámster chino |
| CIP | <i>cleaning in place</i> |
| CMV | cytomegalovirus |
| CO ₂ | dióxido de carbono |
| Col. | colaboradores |
| CR | concentración real |
| <i>Ct</i> | <i>threshold cycle</i> |
| CV | coeficiente de variación |
| cPPT | <i>central polypurine tract</i> |
| CRISPR | <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> |
| DAD | detección con arreglo de diodos |
| DC | dicroísmo circular |
| DHFR | dihidrofolato reductasa |
| DLS | <i>dynamic light scattering</i> |
| DMEM | medio de Eagle modificado por Dulbecco |
| DMSO | dimetilsulfóxido |
| Dol-P | lípidol dolicol fosfato |
| DGJ | deoxygalactonojirimycin |
| D-t-EtDO-P4 | <i>1-ethylendioxyphenyl-2-palmitoylamino-3-pyrrolidino-propanol</i> |
| D-t-pOH-P4 | <i>1-4'-hydroxyphenyl-2-palmitoylamino-3-pirrolidino-propanol</i> |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | ácido etilendiaminotetraacético |
| EF-1 α | factor 1 alfa de elongación |
| ELISA | enzimoinmunoensayo |
| EMA | <i>European Medicines Agency</i> |
| EPF | enfermedades poco frecuentes |
| EPO | eritropoyetina |
| ER | enfermedades raras |
| ES | enfermedades serias |

| | |
|---------------------------------|--|
| Fe(CN) ₅ NO | nitroprusiato de sodio |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FITC | Isotiocianato de fluoresceína |
| FT | <i>flowthrough</i> |
| Fuc | fucosa |
| FVIII | factor VIII de la cascada de coagulación sanguínea |
| Fw | en sentido directo |
| gag | proteína de la cápside lentiviral |
| Gal | Galactosa |
| GalNAc | <i>N</i> -acetilgalactosamina |
| Gb3 | Globotriaosilceramida |
| GHT | glicina, hipoxantina y timidina |
| Glc | glucosa |
| GlcNAc | <i>N</i> -acetilglucosamina |
| GMP | buenas prácticas de manufactura |
| GOD | glucosa oxidasa |
| GS | glutamina sintetasa |
| H ₂ O ₂ | peróxido de hidrógeno |
| H ₂ SO ₄ | ácido sulfúrico |
| HCPs | proteínas relacionadas al huésped |
| HEK293 | células embrionarias de riñón humano |
| HF | filtro de fibra hueca |
| HIC | cromatografía hidrofóbica |
| HILIC | cromatografía líquida de interacción hidrofóbica |
| HIV-1 | virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 |
| HPLC | cromatografía líquida de alta performance |
| ICH | <i>International Conference on Harmonization</i> |
| ICV | integral de células viables |
| IEF | isoelectroenfoque |
| IEX | cromatografía de intercambio iónico |
| Igs | inmunoglobulinas |
| IRES | sitio interno de entrada del ribosoma |
| LAL | test de endotoxinas |
| LB | medio de cultivo Luria-Bertani |
| LOD | límite de detección |
| LOQ | límite de cuantificación |
| LPs | partículas lentivirales |
| LSD | <i>least significant difference</i> |
| LTR | <i>long terminal repeats</i> |
| LVs | vector lentiviral |
| Lyso-Gb3 | Globotriaosilesfingosina |
| NaAc | acetato de sodio |
| Na ₂ CO ₃ | carbonato de sodio |
| Na ₂ EDTA | disodio etilendiaminotetraacetato dihidratado |
| NaHCO ₃ | carbonato ácido de sodio |
| Neu5Ac | ácido acetilneuramínico |
| Neu5Gc | ácido glicolilneuramínico |
| NH ₄ Cl | cloruro de amonio |
| M6P | manosa-6-fosfato |

| | |
|--------------|---|
| Man | manosa |
| MALLS | <i>multi angle laser light scattering</i> |
| MCB | banco de células maestro |
| MEM | medio esencial mínimo |
| MS | detección en masa |
| MSX | metionina sulfoximina |
| MTX | metotrexato |
| NK | <i>natural killer</i> |
| OD | oxígeno disuelto |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| ON | <i>overnight</i> |
| OST | oligosacariltransferasa |
| PAGE | electroforesis en gel de poliacrilamida |
| PBS | solución salina de fosfatos |
| PCVD | <i>porcine circovirus diseases</i> |
| PDMP | D- <i>Threo</i> -1-Phenyl-2-decanoylamino-3-morpholinopropanol |
| PEG | polietilenglicol |
| PEI | polietilenimina |
| pI | punto isoeléctrico |
| PNGAsa F | péptido-N4-(<i>N</i> -acetil- β -glucosaminil)asparagina amidasa |
| POD | peroxidasa |
| pol | proteína polimerasa lentiviral |
| PVDF | difluoruro de polivinilo |
| qp | velocidad específica de consumo o producción de metabolitos |
| qPCR | reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa |
| RCLs | <i>replication-competent lentivirus</i> |
| RE | retículo endoplasmático |
| Rev | proteína lentiviral Rev |
| RM6P | receptores M6P |
| RMCE | <i>recombinase mediated cassette exchange</i> |
| RMN | resonancia magnética nuclear |
| ROS | especies reactivas de oxígeno |
| RRE | <i>Rev response element</i> |
| Rv | en sentido reverso |
| SEAP | <i>secreted alkaline phosphatase</i> |
| SEC | cromatografía de exclusión molecular |
| SEN | sensibilidad |
| SEN γ | sensibilidad analítica |
| SDS | dodecilsulfato de sodio |
| SFB | suero fetal bovino |
| Sfit | desvío estándar de los residuos de la regresión lineal |
| SIN | <i>self-inactivated</i> |
| SN | sobrenadante de cultivo |
| TAE | solución de Tris-acetato-EDTA |
| TALENs | <i>Transcription Activator Like Effectors Nucleases</i> |
| TBS | solución de Tris-NaCl 150 mM |
| TE | solución de Tris-EDTA |
| TEG | solución de Tris-EDTA-Glucosa |

| | |
|------------|--|
| TFA | ácido trifluoroacético |
| TFF | filtración por flujo tangencial |
| TG | transgen |
| TN | Tris-NaCl 100 mM |
| TOOS | <i>N</i> -etil- <i>N</i> -(2 hidroxil-3-sulfopropil) <i>m</i> -toluidina |
| TRE | Terapias de Reemplazo Enzimático |
| Tris | Tris-(hidroximetil)-aminoetano |
| Tween 20 | polisorbato 20 |
| UCOES | elementos de apertura de la cromatina ubicuos |
| UDP | uridina difosfato |
| UE | Unión europea |
| UT | unidad de transducción |
| UV | ultravioleta |
| VSV | virus de la estomatitis vesicular |
| VC | volumen de columna |
| WAX | cromatografía de intercambio aniónico débil |
| <i>wb</i> | <i>western blot</i> |
| <i>WCB</i> | banco de células de trabajo |
| WPRES | <i>woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element</i> |
| <i>wt</i> | <i>wild type</i> |
| ZFPs | <i>Zinc Finger Nucleases</i> |

CÓDIGO DE UNA Y TRES LETRAS PARA AMINOÁCIDOS

| | | |
|--------------|---|-----|
| Alanina | A | Ala |
| Arginina | R | Arg |
| Asparagina | N | Asn |
| Aspártico | D | Asp |
| Cisteína | C | Cys |
| Fenilalanina | F | Phe |
| Glicina | G | Gly |
| Glutámico | E | Glu |
| Glutamina | Q | Gln |
| Histidina | H | His |
| Isoleucina | I | Ile |
| Leucina | L | Leu |
| Lisina | K | Lys |
| Metionina | M | Met |
| Prolina | P | Pro |
| Tirosina | Y | Tyr |
| Treonina | T | Thr |

UNIDADES

| | |
|-----------------|--|
| Å | Ångström (1×10^{-10} m) |
| cm | centímetro |
| mm | milímetro |
| µm | micrómetro |
| nm | nanómetro |
| cm ² | centímetro cuadrado |
| kg | kilogramo |
| g | gramo |
| mg | miligramo |
| µg | microgramo |
| ng | nanogramo |
| l | litro |
| ml | mililitro |
| µl | microlitro |
| h | hora |
| min | minuto |
| s | segundo |
| M | molar |
| mM | milimolar |
| µM | micromolar |
| nmol | nanomol |
| Ω | Ohm |
| pmol | picomol |
| ppb | partes por billón ($\mu\text{g.l}^{-1}$) |
| U | unidades |
| UI | unidades internacionales |
| kDa | kilodalton |
| rpm | revoluciones por minuto |
| V | voltio |
| W | vatio |
| % (v/v) | mililitros de solvente en 100 ml de solución |
| % (p/v) | gramos de soluto en 100 ml de solución |
| A | amperio |
| °C | grado Celsius |

RESUMEN

La enfermedad de Fabry (OMIM 301500) es un desorden metabólico asociado al cromosoma X en forma recesiva, producido por una alteración en el catabolismo de los esfingolípidos como resultado de la actividad defectiva de la enzima α -Galactosidasa A. Se caracteriza por el depósito progresivo de residuos α -D galactósidos terminales que forman parte de glicoesfingolípidos neutros, principalmente de Globotriaosilceramida (Gb3), en los lisosomas de la mayoría de los tejidos viscerales y en los fluidos corporales.

La Terapia de Reemplazo Enzimático (TRE), a partir de la cual la enzima mutada o ausente es reemplazada con la administración exógena de una variante recombinante en forma crónica al paciente, está disponible para el tratamiento de la enfermedad de Fabry desde el año 2001. Se han desarrollado dos presentaciones comerciales: *agalsidase beta* (Fabrazyme®; Genzyme Corporation) y *agalsidase alfa* (Replagal®; Shire Human Genetic Therapies). Uno de los principales inconvenientes de este tipo de terapias es su elevado costo, debido a la falta de información respecto de las características clínicas, etapas y el curso normal de la enfermedad, el número reducido de pacientes y la necesidad de administración de elevadas y repetidas dosis. Otras desventajas consisten en la corta vida media en circulación y eficacia limitada, fundamentalmente en pacientes en un estadio avanzado de la enfermedad. En este contexto, se han propuesto numerosas estrategias tratando de reducir los costos del proceso de producción global. De igual manera, el desarrollo de nuevas alternativas farmacológicas con características mejoradas resulta de gran interés.

En el presente trabajo de tesis se desarrolló una tecnología de producción de la enzima alfa Galactosidasa A humana recombinante (rh α GAL) para uso terapéutico. En una primera etapa del trabajo, se llevó a cabo el desarrollo de métodos analíticos confiables que permitieran el seguimiento del proceso de producción y el aseguramiento de la calidad del producto final.

Posteriormente, se generaron líneas y clones recombinantes en células CHO-K1, mediante el empleo de la tecnología de vectores lentivirales de tercera generación para la transferencia de material genético a la célula huésped. Los resultados demostraron las ventajas de este sistema sobre las metodologías tradicionales de transfección. En tal sentido, se obtuvieron clones con valores de productividad específica de hasta 8 veces mayor, y valores de actividad específica, en sobrenadante de cultivos, de 1,8 veces mayor que los valores reportados para el clon AGA5.3, el cual constituye la actual plataforma para la producción de uno de los medicamentos

comerciales (Fabrazyme®, Genzyme). Asimismo, se emplearon distintos sistemas de cultivo: cultivos adherentes y en suspensión, en modo *batch*, *fed-batch* y continuo con perfusión en biorreactor.

En una tercera etapa se desarrolló el protocolo de purificación a partir de sobrenadante de cultivos, que consistió en un primer paso empleando una resina de intercambio aniónico débil (*DEAE Sepharose Fast Flow*) y un segundo paso por interacción hidrofóbica (*Butyl Sepharose 4 Fast Flow*). La enzima se purificó a partir de la cosecha perteneciente a la línea celular CHO GAL TD3 50 (rhαGAL-L) y a partir del clon P3G2 derivado de ésta (rhαGAL-C). Luego del segundo paso de purificación, se alcanzó una pureza de aproximadamente 98% y una recuperación del 60%.

La caracterización fisicoquímica y bioquímica de ambas moléculas, evidenció similares características a una de las variantes utilizadas en la TRE para la enfermedad de Fabry, producida en células CHO (Fabrazyme®). Ambas proteínas purificadas presentaron un comportamiento tipo Michaelis-Menten, así como la molécula de referencia. La composición estructural de las tres moléculas, determinada por espectroscopia de fluorescencia, demostró ser similar. Con respecto al estudio de estabilidad frente a proteasas, la molécula rhαGAL-L no presentó variaciones en comparación con la molécula de referencia, mientras que la molécula rhαGAL-C presentó una estabilidad significativamente aumentada. Cabe destacar que ambas moléculas purificadas, mostraron propiedades mejoradas con respecto al perfil de glicosilación, en particular presentando un mayor contenido de ácido siálico Neu5Ac y una menor proporción de la variante inmunogénica Neu5Gc, atributos que darían lugar a una mejora de la eficacia *in vivo* de la terapia. Asimismo, se logró confirmar una correcta internalización y localización sub-celular hacia lisosomas.

En conclusión, todos los resultados obtenidos demuestran que el bioproceso desarrollado representa una alternativa muy interesante para la producción de la enzima rhαGAL para uso terapéutico.

ABSTRACT

Fabry's disease (OMIM 301500) is an X-linked recessive metabolic disorder caused by deficiency in lysosomal α -Galactosidase A, producing an alteration in the catabolism of sphingolipids. This results in progressive lysosomal accumulation of neutral glycolipids containing terminal α -galactose residues, primarily globotriaosylceramide (Gb3), in the tissues and body fluids.

Enzyme replacement therapy (ERT), in which the defective enzyme is replaced by an exogenous chronic administration of a recombinant variant, has been available for Fabry disease treatment, since 2001. Currently, two commercial formulations have been developed: *agalsidase beta* (Fabrazyme®; Genzyme Corporation) and *agalsidase alfa* (Replagal®; Shire Human Genetic Therapies). However, this approach presented some disadvantages related to the high cost of the treatment due to the lack of information about clinical features and stages of the disease, small number of patients and the need of repeated administration of large amount of the enzyme. Moreover, it should be mentioned other drawbacks such as its short half-life in circulation and limited efficacy, mainly in patients with advanced stages of the disease. In this context, several strategies trying to alleviate the global production process cost have been proposed. In addition, improved therapies are nowadays under investigation.

In the present thesis work a production technology of the recombinant human alpha Galactosidase A (rh α GAL) enzyme for therapeutic use was developed. First, the optimization of reliable analytical methods was developed, in order to allow the tracing of the production process and the quality assurance of the final product.

After that, recombinant cell lines and clones were developed in CHO-K1 cells, using third-generation lentiviral vectors as DNA deliver system. This system allowed us to improve the specific productivities in comparison with traditional transfection methods. By this means, our clones achieve up to eightfold higher productivities and up to 1.8-fold higher specific enzymatic activities in culture supernatants compared to the ones corresponding to AGA5.3 clone, which constitutes the actual platform for the production of the commercially available product (Fabrazyme®). Besides, different culture systems were employed: adherent and suspension cultures in batch, fed-batch and continuous perfusion mode in bioreactors.

Later, a purification protocol was developed, using a weak ionic exchange resin (DEAE Sepharose Fast Flow) as first step, and a hydrophobic interaction resin as second step (Butyl Sepharose 4 Fast Flow). The enzyme was purified from suspension

culture supernatants of CHO α GAL TD3 50 cell line (rhaGAL-L) and P3G2 clone (rhaGAL-C). After the second step, the active enzyme was purified with 98% purity and 60% yield.

Importantly, both purified enzymes evidenced biochemical and physicochemical properties similar to those of the current ERT available for Fabry's disease produced in CHO cells (Fabrazyme®). Both purified enzymes exhibited a Michaelis-Menten behavior, as well as the reference molecule. No apparent differences were detected in their structural conformation, as assessed by fluorescent spectroscopy. Regarding stability in plasma, rhaGAL-L presented the same stability than the reference molecule, and the rhaGAL-C showed a significant higher stability. Moreover, our enzymes exhibited improved properties regarding glycosylation, in particular higher Neu5Ac sialic acid content and a reduced percentage of antigenic Neu5Gc glycan, attributes which may derive in an enhanced *in vivo* efficacy of rhaGAL. In addition, the enzyme uptake into primary fibroblasts of Fabry patients and HEK293T/17 cells and the proper lysosomal localization were confirmed.

Taken together, our results represent a significant advance that could improve the overall production process of a promising therapeutic alternative for Fabry disease.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Expresión de proteínas recombinantes para uso terapéutico

Las proteínas son sintetizadas por todos los seres vivos como parte de su metabolismo natural. Algunas proteínas, como las enzimas, actúan como biocatalizadores acelerando la tasa de reacción al disminuir la energía de activación, mientras que otras tienen roles importantes en la respuesta inmune, señalización, adhesión y ciclo celular. A su vez, son producidas en industrias biotecnológicas con la ayuda de la ingeniería genética y la ingeniería de proteínas. Tanto las proteínas obtenidas a partir de fuentes naturales como aquellas obtenidas de modo recombinante han generado un incremento productivo en áreas como la medicina, diagnóstico, alimentos, nutrición, industria química, textiles, entre otras [1].

La primera vacuna proteica fue la vacuna para el virus de la viruela bovina desarrollada en 1796. La industria de la fermentación microbiana surgió a principios de 1900, cuando comenzaron las primeras fermentaciones anaeróbicas a mayor escala para la producción de químicos como la acetona y el butanol, seguido de la producción de ácido cítrico. La penicilina se descubrió en 1927 pero su desarrollo no ocurrió sino hasta comienzos de 1940. En 1922 Banting y Bens produjeron la primera proteína de uso farmacéutico: la insulina. La era de la biotecnología moderna comenzó en 1971 con el establecimiento de *Cetus Corporation* en California, alrededor de 1 a 2 años previo al descubrimiento de la tecnología del ADN recombinante. Posteriormente, surgieron otras compañías como *Genentech*, *Amgen* y *Biogen* [1].

Para el año 2002, alrededor de 155 productos farmacéuticos y vacunas fueron desarrollados por compañías farmacéuticas. Dentro de las proteínas recombinantes de uso farmacéutico se puede mencionar a la insulina, albúmina, hormona de crecimiento humano, Factor VIII, entre otras. El primer paso en la producción de una proteína en forma recombinante es la obtención de la secuencia codificante, luego la proteína es expresada en el huésped heterólogo seleccionado. Existen diversos sistemas de expresión tales como cultivos en bacterias, levaduras, hongos filamentosos, células de mamíferos, plantas o insectos o a través del empleo de plantas o animales transgénicos. La calidad, funcionalidad, velocidad de producción y rendimiento son los factores más importantes a controlar. Normalmente, las proteínas no glicosiladas son producidas en *Escherichia coli* (*E. coli*) o levaduras y constituyen un 40% de las proteínas que existen en el mercado. Las glicoproteínas, por su parte, son producidas en cultivos de células de mamíferos. Aproximadamente, un 50% de las proteínas glicosiladas para uso terapéutico son producidas en células CHO (*Chinese Hamster*

Ovary cells). Levaduras, células de insectos y hongos usualmente no son capaces de dar lugar a proteínas con el correcto perfil de glicosilación [1].

2. Sistemas de expresión

2.1. Bacterias

E. coli es uno de los huéspedes más utilizados para la producción de proteínas en forma heteróloga, presentando como principales ventajas la elevada tasa de expansión, con rápidos y altos niveles de expresión. Como se mencionó, es un sistema útil para la expresión de proteínas no glicosiladas. Asimismo, se conoce la maquinaria de transcripción, traducción y plegamiento de las proteínas en *E. coli*. Su genoma puede ser modificado fácilmente, el control del promotor no es complejo y el número de copias de plásmidos puede ser fácilmente alterado. Este sistema es capaz de acumular proteínas recombinantes hasta en un 80% de su peso seco y llega a sobrevivir a diversas condiciones ambientales [1, 2]. Sin embargo, presenta ciertas desventajas que deben superarse para garantizar la expresión de las proteínas de modo eficiente. Las elevadas densidades celulares pueden resultar tóxicas debido a la formación de acetato, lo que se controla modificando los niveles de oxígeno, adicionando glucosa, o bien, manteniendo la velocidad específica de crecimiento por debajo de los niveles de toxicidad. Las proteínas que se dirigen hacia cuerpos de inclusión pueden estar inactivas y no solubles por lo que se requiere de un proceso de renaturalización o *refolding* adicional, que usualmente llega a ser complejo. La secreción de proteínas al espacio periplásmico o al medio de cultivo tiene muchas ventajas sobre la producción intracelular a cuerpos de inclusión, favoreciendo el proceso de purificación (*downstream processing*), el plegamiento y la estabilidad *in vivo*, y permitiendo la producción de proteínas solubles y activas [1, 3].

Otro sistema bacteriano empleado es el *Bacillus* Gram negativo (*B. Gram-*), fundamentalmente en la industria, ya que los mismos no producen ningún tipo de exo o endotoxina (lipopolisacárido). La secreción de la proteína al medio de cultivo facilita el *downstream processing*, eliminando la necesidad de realizar disrupción celular o el empleo de procesos químicos. Dentro de las especies más utilizadas se pueden mencionar *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *B. brevis*. La principal desventaja del empleo de *B. subtilis* es la gran producción de proteasas, pudiendo llegar a destruir las proteínas recombinantes.

2.2. Levaduras

Las levaduras son utilizadas cuando las proteínas no se pueden producir adecuadamente en *E. coli* debido a problemas relacionados con un plegamiento

adecuado o la necesidad de obtener proteínas glicosiladas. Las mismas, tienen menos requerimientos y un costo inferior que las células de insecto o células animales, presentando diversas modificaciones postraduccionales. Las dos especies ampliamente utilizadas son *Sacharomises cerevisiae* y *Pichia pastoris* (levadura metilotrófica) [1, 3].

Las levaduras metilotróficas son huéspedes muy atractivos para el uso industrial ya que alcanzan altas densidades, y los niveles de producción pueden ser manipulados por una simple modificación del medio de cultivo, logrando rendimientos de hasta 130 g.l⁻¹. Otra característica interesante es que son capaces de emplear metanol como única fuente de carbono, lo que implica una reducción en el costo de producción. *P. pastori* tiene menor contenido de residuos de alta manosa que *S. cerevisiae*, alrededor de 20 residuos en comparación con los 50 a 150 residuos de *P. pastori*. A su vez, *P. pastori* carece de la enzima α -1,3-manosil transferasa que es responsable de generar residuos altamente inmunogénicos en humanos. Muchas de las proteínas producidas en *P. pastori* requieren el empleo de chaperonas para asegurar un adecuado plegamiento de la proteína recombinante. Mediante ingeniería genética, se ha logrado manipular la maquinaria de glicosilación de la levadura logrando proteínas con patrones de glicosilación similares a los obtenidos en cultivos de células de mamíferos [1, 4].

2.3. Hongos filamentosos

Los hongos filamentosos como *Aspergillus niger* resultan sistemas heterólogos atractivos para la expresión de proteínas recombinantes debido a su habilidad de secretar proteínas activas con modificaciones postraduccionales. Sin embargo, en algunos casos se han obtenido bajos rendimientos proteicos y en otros, las proteínas pueden ser degradadas por proteasas. Asimismo, para aprovechar completamente el potencial de este sistema, se deberá investigar de modo exhaustivo su fisiología y particularmente el mecanismo de glicosilación [1, 5].

2.4. Células de insectos

Representan un sistema heterólogo adecuado para la expresión de proteínas de mamíferos. En 1983 se propuso por primera vez el empleo del sistema baculovirus como vector para la expresión de proteínas recombinantes, utilizando como huésped líneas celulares de insecto. El baculovirus más ampliamente utilizado es el virus de la polihidrosis nuclear, es un virus ADN doble cadena y un patógeno natural de células de lepidóptero, las cuales son fácilmente adaptables a crecer en cultivos *in vitro*. Una de las principales ventajas del sistema baculovirus-células de insecto es que produce

altas concentraciones de proteína recombinante, principalmente porque utiliza el promotor del gen de la poliedrina (polh), uno de los promotores más fuertes de la naturaleza. La polihedrina puede constituir hasta el 50% de la proteína de la célula infectada por el virus silvestre. Su función es proteger al virus del ambiente, la cual no es requerida en cultivos *in vitro*, por lo que es posible sustituir el gen de la poliedrina por un gen de interés sin afectar la replicación viral. De esta forma se han logrado obtener concentraciones de proteína recombinante de hasta 1 g.l^{-1} [6]. Asimismo, las células de insectos son capaces de producir diversas modificaciones postraduccionales (fosforilación, *N*- y *O*- glicosilación, acilación, amidación, carboximetilación, entre otras), permitiendo un adecuado plegamiento proteico y formación de puentes disulfuro, a diferencia de lo que ocurre en el citoplasma de *E. coli*. Otra ventaja es la posibilidad de trabajar con cultivos en suspensión y en altas densidades celulares. Entre las proteínas que han sido expresadas en células de insecto se destaca la producción comercial de vacunas para uso veterinario como la vacuna para la peste porcina (Porcili Pesti®, Merck) o la vacuna contra el síndrome multisistémico del desmedro postdestete (*porcine circovirus diseases*, PCVD) producida tanto por Merck como por B. Ingelheim. Asimismo, en el mercado existe una vacuna para la prevención del cáncer de cuello de útero (CERVARIX®) y otra para el tratamiento del cáncer de próstata (PROVENGE®), obtenidas a partir del empleo de este sistema de expresión [1, 7].

Una de las principales desventajas que presenta este sistema es la formación de perfiles de glicosilación incorrectos y en algunos casos inmunogénicos, por lo que se requiere un análisis exhaustivo del perfil de glicanos de cada proteína recombinante [1, 8].

2.5. Plantas transgénicas

Para la producción de proteínas recombinantes el uso de plantas, en comparación con otros sistemas de expresión, es más seguro, requiere menos tiempo y es superior en términos de almacenamiento y distribución [1]. Las plantas transgénicas pueden ser producidas de dos maneras. Una forma es insertar el gen de interés en un virus que normalmente se encuentra en plantas, como el virus del mosaico del tabaco. La otra manera es insertar el gen deseado directamente en el ADN de la planta.

La degradación proteolítica y el silenciamiento génico son obstáculos propios de los sistemas basados en plantas. A su vez, el empleo de plantas transgénicas tiene asociado posibles contaminaciones con pesticidas, herbicidas y metabolitos tóxicos. Debido a la ausencia de sialidación y la presencia de residuos potencialmente

inmunogénicos como α 1,3-fucosa y β 1,2-xilosa, se han reportado algunos logros en la humanización de la glicosilación y en la remoción de residuos inmunogénicos [4].

Actualmente, hay algunas terapias derivadas de plantas aprobadas en Europa para uso tópico en seres humanos. Asimismo, recientemente se ha aprobado en Estados Unidos y en Europa, el uso de *Taligluserasa alfa* (glucocerebrosidasa lisosomal, Pfizer) para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher y se encuentra en fase clínica III de desarrollo *Pegunigalsidase alfa* (Protalix Biotherapeutics) para el tratamiento de la enfermedad de Fabry [9–11].

2.6. Células de mamíferos

En 1986, se aprobó la comercialización de la primera proteína recombinante terapéutica producida en células de mamíferos (activador tisular del plasminógeno, tPA, Activase, Genentech). Actualmente, alrededor de un 60 a 70% de las proteínas recombinantes bioterapéuticas son producidas en cultivos de células animales [12].

El cultivo de células animales es el sistema normalmente empleado para la producción de glicoproteínas terapéuticas debido a que la maquinaria de procesamiento de proteínas, incluyendo el proceso de glicosilación y plegamiento, se asemeja a la humana [13]. Los anticuerpos monoclonales y las proteínas fusionadas a Fc son producidos principalmente en células CHO, células de mieloma de ratón (NS0, SP2/0) e hibridomas. De igual manera, un gran porcentaje de las proteínas recombinantes para uso terapéutico son producidas en células CHO debido a su amplia caracterización y su capacidad de glicosilación. Otras líneas celulares empleadas son las células de riñón de hámster bebé (*Baby Hamster Kidney*, BHK21), fibrosarcoma humano (HT1080), linfoma humano (Namalwa) y células de embrión de riñón humano 293 (*Human Embryonic Kidney 293*, HEK293) [4].

Mediante el cultivo en células CHO se lograron niveles de producción de tPA de 34 mg.l⁻¹ con un 47% de recuperación global, lo que resulta bajo en comparación a los valores obtenidos en *E. coli* (460 mg.l⁻¹). Sin embargo, en éste último caso, la recuperación sólo es del 2,8% ya que se produce en cuerpos de inclusión y los rendimientos de renaturalización son bajos [1].

Con el transcurso del tiempo se han desarrollado numerosas estrategias para incrementar los valores de productividad. En este sentido, en 1986 se producían 50 mg.l⁻¹ de proteína recombinante, mientras que en 2004 se alcanzaron valores de hasta 4,7 g.l⁻¹. En el caso de anticuerpos monoclonales, se han reportado valores de entre 0,7 a 1,4 g.l⁻¹, logrando alcanzar valores de hasta 2,5 g.l⁻¹ en cultivos *fed-batch*.

Dentro de las desventajas del empleo del cultivo de células animales se pueden mencionar los bajos niveles de productividad en comparación a otros sistemas, el elevado costo o la posible contaminación con virus [1, 3].

2.7. Comparación de los distintos sistemas de expresión

Normalmente, los sistemas de expresión basados en *E. coli*, *P. pastoris* y baculovirus son utilizados en investigación y estudios de estructura y función de proteínas por ser sistemas de alto rendimiento. Sin embargo, los cultivos de células de mamíferos han sido los preferidos para la producción industrial de bioterapéuticos, junto con la estrategia de producción de proteínas recombinantes mediante la formación de cuerpos de inclusión. No obstante, ningún sistema de expresión puede considerarse superior a otro. Para cada producto a desarrollar se debe identificar y optimizar el sistema de expresión más adecuado en base a las propiedades del producto, el organismo y los casetes de expresión a implementar. En general, los criterios de selección del sistema de expresión en la industria farmacéutica se basan en el perfil farmacológico buscado en relación con el perfil de glicosilación y la rentabilidad del mismo. Además, se debe tener en cuenta la experiencia previa, disponibilidad de herramientas de manipulación genética, si existe o no determinada patente (si ha expirado o no), y aspectos regulatorios a considerar para evitar retrasos en el lanzamiento y comercialización del producto final. En la siguiente sección se detalla el esquema de un proceso de producción de proteínas recombinantes utilizando cultivo de células animales.

3. Proceso de producción de una proteína recombinante de uso terapéutico en cultivo de células animales

El desarrollo de un proceso de producción de proteínas recombinantes en cultivo de células animales sigue un esquema bien establecido (Figura 1). Inicialmente, el transgen (TG) de interés (junto con los elementos regulatorios) es insertado dentro del genoma celular. Asimismo, se suele emplear un segundo gen como marcador de selección, de manera que en presencia de un agente de selección (que es aplicado días posteriores a realizar la inserción del TG), sólo sobrevivan aquellas células que incorporaron dicho marcador. Luego del proceso de selección, las células supervivientes (línea celular heterogénea) se transfieren como células individuales en un segundo cultivo. Posteriormente, éstos se expanden para producir poblaciones clonales que luego son caracterizadas de manera de evaluar el nivel de expresión de la proteína recombinante. Sólo aquellos clones celulares que presentan productividades aceptables son resguardados para posteriores análisis, seleccionando

sólo un candidato clonal para la producción de la proteína recombinante [12]. A partir de este clon se obtiene el banco celular maestro (MCB, *Master Cell Bank*) y de éste el banco de trabajo (WCB, *Working Cell Bank*), de manera de garantizar consistencia lote a lote de producción. También, se debe definir la identidad, pureza, número de células, viabilidad, estabilidad génica, números de copia, identidad e integridad del TG y ausencia de agentes adventicios (virus, bacterias, hongos) y micoplasma.

Por otro lado, es necesario establecer un sistema de cultivo en función de las necesidades de producción. En general, la proteína recombinante es naturalmente secretada al sobrenadante de cultivos o bien se utilizan construcciones que garanticen la secreción de la proteína al medio de cultivo.

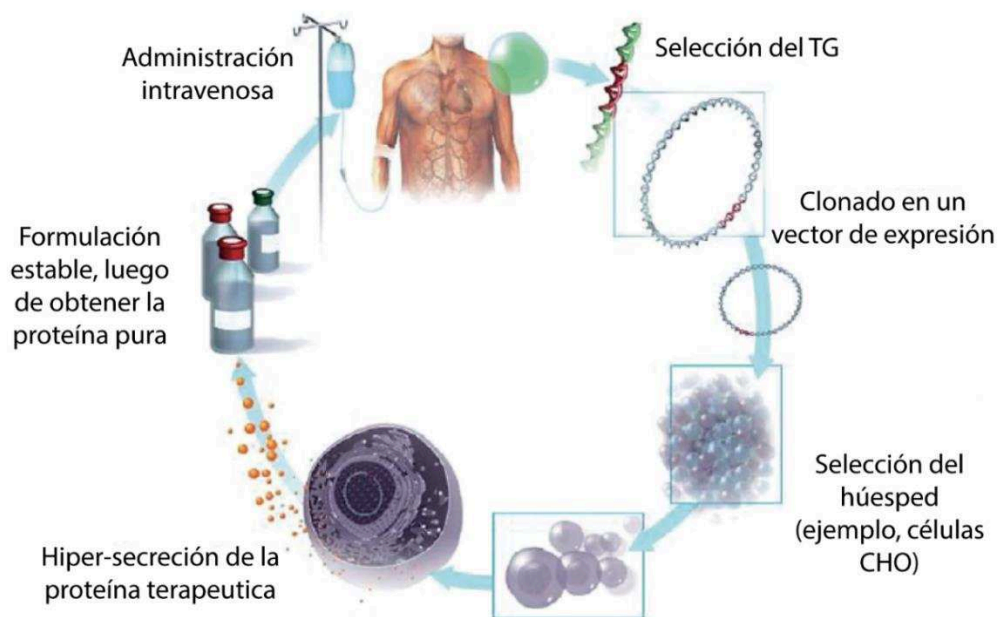


Figura 1. Representación esquemática del proceso de producción de una proteína recombinante para uso terapéutico. (Figura modificada de Dingermann, 2008) [14].

El protocolo de fermentación seleccionado afecta el perfil de impurezas, y por lo tanto, la eficacia del *downstream processing*. De igual manera, puede alterar la solubilidad y estabilidad de la proteína de interés, afectando con ello la calidad y rendimiento del producto purificado. Asimismo, una sobreexpresión de la proteína puede llegar a disminuir ciertos factores necesarios para un adecuado plegamiento proteico. Por todo esto, la fermentación se desarrolla en concomitancia con el protocolo de purificación. La fermentación se puede realizar en modo *batch*, *fed-batch* o continuo. Los procesos en modo *batch* son simples y robustos, pero no permiten alcanzar densidades celulares elevadas, a diferencia de los cultivos en modo *fed-batch*, en los cuales el metabolismo celular puede ser controlado [15]. Por otro lado,

los cultivos continuos (en perfusión), proveen un ambiente favorable para el cultivo de células, removiendo los productos formados y suplementando nutrientes de manera continua. En comparación con los sistemas *batch* o *fed-batch*, este sistema ofrece cultivos prolongados, alcanzando densidades celulares superiores y menor tiempo de residencia del producto en el biorreactor. Esto resulta más favorable para la estabilidad del producto, y es mandatorio en el caso de glicoproteínas inestables. Otra ventaja del modo continuo es el uso de reactores más pequeños en comparación con los procesos *fed-batch*. Existen diversos métodos para la separación celular, basados en diferentes propiedades físicas como la filtración por flujo tangencial, como por ejemplo, el filtro de fibra hueca (*hollow fiber filter*, HF) o centrifugación. Asimismo, existen distintos sistemas que permiten la separación celular en línea asegurando condiciones de esterilidad adecuadas, entre los que se puede mencionar el sistema de filtro de giro (*spin filter*), filtración por flujo tangencial (*tangencial flow filtration*, TFF) o flujo tangencial alternado (*alternating tangential flow*, ATF) [16].

Otro aspecto clave a considerar es el empleo de un medio de cultivo adecuado para el crecimiento celular. En el pasado, el uso de suero fetal bovino (SFB) era necesario para el cultivo de células animales. Sin embargo, actualmente un gran porcentaje de los cultivos a gran escala se realizan en medios libres de suero, empleando péptidos pequeños, factores de crecimiento, lípidos, carbohidratos y moléculas pequeñas. Se evita el uso de suero por su composición indefinida, variación lote a lote, el riesgo de transmitir agentes adventicios (priones y virus, por ejemplo) y su elevado costo [12].

El proceso de producción debe ser caracterizado y validado, demostrando la robustez y reproducibilidad del producto. Todo el equipamiento debe cumplir con los requerimientos de buenas prácticas de manufactura (GMP, *Good Manufacturing Practices*). El protocolo de fermentación puede ser optimizado hasta llegar a la fase clínica III, que debe realizarse en la escala final de producción [15].

Una vez definido el protocolo de purificación, se debe realizar una caracterización bioquímica adecuada de la proteína pura. Se deben desarrollar diferentes técnicas analíticas que permitan definir distintos atributos, y en paralelo, aplicar técnicas analíticas ortogonales, que conduzcan a determinar una propiedad específica. Por otro lado, prácticamente todas las proteínas inducen una respuesta inmunogénica. Existen diferentes factores que determinan la aparición de una respuesta inmunogénica, incluyendo las características del paciente y su estado de salud, aquellas relacionadas con el producto como el diseño de la molécula, sistema de expresión, modificaciones postraduccionales, impurezas, contaminantes, formulación y excipientes, y aquellas relacionadas con la terapia, como la vía de

administración, dosis, frecuencia y duración del tratamiento [17]. Por lo que resulta, entonces, un factor importante a evaluar.

Finalmente, una vez definida cada etapa del proceso de producción, se procede al registro del medicamento, el cual es un procedimiento que conlleva la evaluación y autorización del terapéutico, y es la condición necesaria para la comercialización o puesta en el mercado. Existen diferentes agencias regulatorias. En la Unión Europea (UE) el registro de medicamentos de uso humano se rige por la Directiva 2001/83/CE, del Parlamento Europeo y del Consejo, del 6 de noviembre de 2001, por la que se estableció un código comunitario sobre medicamentos de uso humano, modificada por Directiva 2004/27/CE del Parlamento Europeo y del Consejo del 31 de marzo de 2004, y por el Reglamento (CE) N° 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 31 de marzo de 2004, por el que se dispusieron procedimientos comunitarios para la autorización y el control de los medicamentos de uso humano y veterinario y se creó la Agencia Europea de Medicamentos (EMA, anteriormente denominada -EMEA-Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos). En Estados Unidos, se creó la FDA (*Food and Drug Administration*) en 1906, con la aprobación de la Ley de la Pureza de los Alimentos y Medicamentos (*Pure Food and Drugs Act*). En nuestro país la agencia regulatoria, la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), fue fundada en agosto de 1992, mediante decreto 1490/92, la cual es un organismo descentralizado de la Administración Pública Nacional [18–20].

La información clínica de los medicamentos, previa al registro, se basa en los ensayos clínicos realizados. Éstos, incluidos los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia, deben ser diseñados, realizados y comunicados de acuerdo con las normas de “buena práctica clínica” y con respeto a los derechos, la seguridad y el bienestar de los sujetos del ensayo, que prevalecen sobre los intereses de la ciencia y la sociedad. Antes de su autorización, todos los medicamentos conllevan una investigación, primero en laboratorios (conocida como preclínica) y luego en centros sanitarios (llamada investigación clínica). Los ensayos clínicos se realizan en 4 fases. La fase I constituye el primer paso en la investigación de una sustancia o medicamento nuevo en el hombre. Son estudios de farmacocinética (aquellos procesos que afectan el paso de un fármaco por el organismo) y farmacodinamia (mecanismo de acción de las drogas y sus efectos bioquímicos y fisiológicos) que proporcionan información preliminar sobre el efecto y la seguridad del producto en sujetos sanos o en algunos casos en pacientes (como el caso de los ensayos clínicos en pediatría), y orientan la pauta de administración más apropiada para ensayos posteriores. La fase II representa el segundo estadio y se realiza en pacientes que

padecen la enfermedad o entidad clínica de interés. Tiene como objetivo proporcionar información preliminar sobre la eficacia del producto, establecer la relación dosis-respuesta del mismo, conocer las variables empleadas para medir eficacia y ampliar los datos de seguridad obtenidos en la fase I. Por lo general, estos ensayos clínicos son controlados y con asignación aleatoria de los tratamientos. La fase III implica ensayos destinados a evaluar la eficacia y seguridad del tratamiento experimental intentando reproducir las condiciones de uso habituales y considerando las alternativas terapéuticas disponibles en la indicación estudiada. Se realiza con una muestra de pacientes más amplia y representativa que en la fase anterior. Estos estudios son controlados y aleatorizados. Finalmente, la fase IV incluye ensayos clínicos que se realizan con un medicamento después de su comercialización. Estos ensayos pueden ser similares a los descritos en las fases I, II y III si estudian algún aspecto aún no valorado o condiciones de uso distintas de las autorizadas, como una nueva indicación. También son estudios controlados y aleatorizados [21].

Como se discutió con anterioridad, para que un proceso de producción sea rentable, es de primordial importancia seleccionar clones con elevados niveles de productividad. A continuación se describen distintas estrategias implementadas para lograr dicho objetivo (Figura 2).

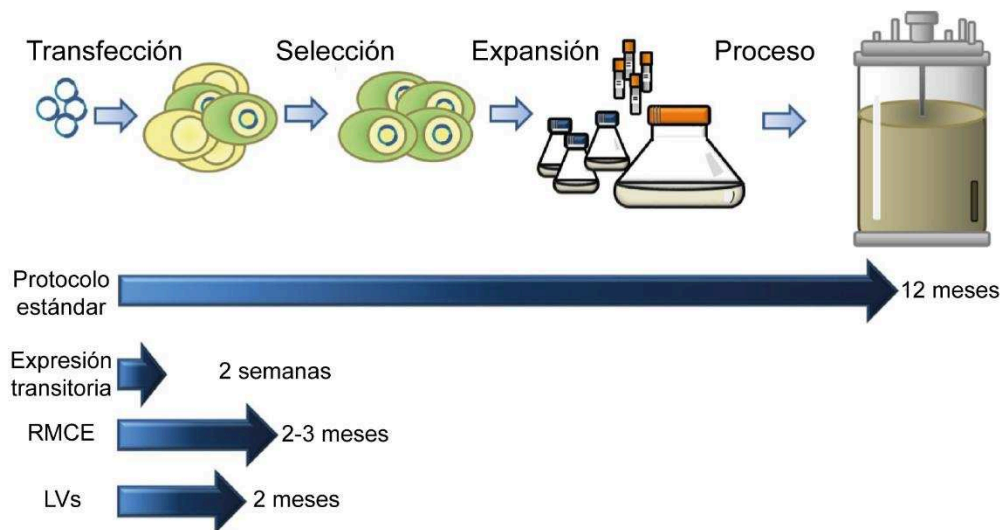


Figura 2. Línea de tiempo para el desarrollo de líneas celulares y posterior producción de un bioterapéutico. Se comparan los tiempos requeridos para la metodología clásica de transfección/selección con nuevos sistemas de expresión. RMCE (*Recombinase Mediated Cassette Exchange*), LVs (*vectores lentivirales*). (Figura modificada de Bandaranayake y Almo, 2014) [22].

4. Transferencia del material genético y desarrollo de líneas celulares en cultivos de células animales

Los vectores de expresión utilizados comúnmente para la generación de líneas celulares recombinantes presentan un promotor viral fuerte (CMV, promotor constitutivo del citomegalovirus, por ejemplo) o un promotor (o potenciador, *enhancer*) celular (EF-1 α , *elongation factor 1 α* , por ejemplo). En la mayoría de los casos, el TG de interés se encuentra como ADN copia (ADNc) sin intrones. Sin embargo, se ha reportado que un aumento en la eficiencia de transporte hacia citoplasma y en el proceso de traducción se halla influenciado por el evento de *splicing*. Es por ello que diversos vectores de expresión contienen secuencias de intrones, los cuales se encuentran normalmente localizados entre el promotor y la secuencia del TG de interés [23].

En 1973, Graham y van der Eb reportaron la transferencia de nanopartículas de ADN empleando fosfato de calcio. Actualmente, existen distintos sistemas para la transferencia del material genético: precipitación por fosfato de calcio, electroporación, lipofección y transferencia mediada por polímeros (PEI, polietilenimina). Dentro de este tipo de procedimientos también se puede mencionar la “infección” con una partícula viral, proceso conocido como transducción. Asimismo, el TG puede expresarse en modo transitorio o de manera estable [22, 24, 25].

La expresión transitoria del TG se define como la producción de la proteína recombinante en un período corto de tiempo (10 a 14 días). Normalmente, el TG de interés se clona en un vector no viral y las células se transfectan mediante un método químico, empleando fosfato de calcio o PEI. A diferencia de lo que ocurre en un método de expresión estable del TG, las células no atraviesan un proceso de selección durante la fase de producción. Este procedimiento ha sido desarrollado principalmente con células HEK293 y CHO. Permite evaluar la funcionalidad del vector construido, así como también optimizar diferentes combinaciones de promotores y otros elementos útiles para la expresión de la proteína recombinante. La implementación de esta tecnología presenta ciertas desventajas asociadas a la productividad de la proteína en estudio y la heterogeneidad del producto. Sin embargo, recientemente se ha propuesto el empleo del método de expresión transitoria en gran escala, utilizando reactores tipo tanque agitado. Se han reportados productividades de hasta 1 g.l⁻¹ en células HEK293 en biorreactores de volumen útil de 100 l, siendo inferiores en el caso de células CHO [26].

Hasta el momento no se ha reportado la aprobación de la producción de una proteína terapéutica mediante este método, debido a que no resulta sencillo demostrar la reproducibilidad y consistencia del producto proteico obtenido [27].

La generación de líneas celulares estables, por su parte, depende de la integración estable del plásmido en el cromosoma celular. La principal desventaja asociada al empleo de las mismas, radica en que se requiere de un tiempo prolongado para su generación. Tradicionalmente, la generación de líneas celulares recombinantes estables se ha llevado a cabo mediante el empleo de la metodología de transfección que resulta en una baja frecuencia de integración del TG de interés en el genoma celular [28], es por ello que la etapa de selección es sumamente importante a los fines de que sobrevivan sólo aquellas células que hayan incorporado el transgén de interés al genoma celular. Aunque exitoso, este método consume mucho tiempo, entre 5 y 12 meses, desde la transfección del material genético hasta la obtención de una línea productora [27].

La linealización del plásmido previo a la transferencia génica mejora la eficiencia de la transfección estable, aunque el plásmido superenrollado, luego de 1 a 2 h postransfección, es linealizado por las endo y exonucleasas celulares. Luego las enzimas de recombinación catalizan la integración aleatoria del TG en el genoma celular por recombinación no homóloga. El sitio de integración tiene un efecto importante en la tasa de transcripción del TG (efecto posición). Se ha descrito que la integración en regiones de heterocromatina resulta en una baja o nula tasa de expresión, mientras que la integración en regiones de eucromatina frecuentemente permite la expresión génica. Sin embargo, la inserción del TG en dichas zonas a veces no resulta suficiente para asegurar su expresión a través del tiempo ya que puede ser rápidamente inactivado (silenciado), probablemente por el efecto de heterocromatina próxima. El silenciamiento génico se correlaciona con un aumento de la hipoacetilación de histonas, metilación del aminoácido lys 9 o la histona H3 y metilación de la región CpG próxima al promotor. Se han reportado diferentes estrategias para contrarrestar el efecto posición, empleando elementos regulatorios en *cis* como insulators, elementos de apertura de la cromatina ubicuos (UCOEs, *ubiquitous chromatin opening element*), regiones S/MARs y elementos conservados anti-represores [22, 24, 29, 30]. Asimismo, recientemente se han reportado estrategias que permiten amplificar el TG de interés, o bien, insertarlo en sitios específicos del genoma celular. En la siguiente sección, se detallan algunas estrategias que han permitido mejorar los niveles de producción.

4.1. Amplificación del TG de interés

Existe una amplia variedad de sistemas para la selección de las células transfectadas, dentro de las que se puede mencionar la resistencia a antibióticos como la neomicina, higromicina y puomicina. Sin embargo, la selección por la presencia del

gen DHFR (dihidrofolato reductasa) en las células CHO deficientes en DHFR (CHO *dhfr*), enzima esencial para la síntesis de purina y pirimidina, es una de las metodologías más ampliamente utilizadas [12].

Las células CHO empleadas en la producción de proteínas terapéuticas se originaron en el año 1957, a partir de la inmortalización de cultivos primarios de células ováricas de un hámster chino (*Cricetulus griseus*). Se generaron diferentes variantes, siendo las más comúnmente utilizadas una línea celular dependiente de glicina (CHO-K1) y dos líneas celulares deficientes de actividad DHFR (CHODUKX y CHO-DG44), las cuales requieren glicina, hipoxantina y timidina (GHT) para su crecimiento [31].

Una mayor selectividad permite reducir los tiempos de *screening* del candidato clonal con niveles de productividad aceptables. Así, el sistema *dhfr* puede aumentar el grado de astringencia empleando metotrexato (MTX), una droga que bloquea la actividad *dhfr*. En este sistema de expresión, las células CHO *dhfr*- deben ser transfectadas con un vector que contenga el transgén de interés y el gen DHFR. El empleo de MTX en concentraciones crecientes durante sucesivas rondas permite seleccionar aquellas células que demuestren una elevada capacidad de producción de la enzima DHFR y, por lo tanto, de la proteína de interés (de 10 a 20 veces superiores) [22, 29].

Otro sistema de amplificación consiste en emplear células CHO y cultivarlas en presencia del inhibidor de la glutamina sintetasa (GS): metionina sulfoximina (MSX). Dicha enzima es fundamental para la síntesis de glutamina a partir de glutamato y amonio y, en consecuencia, para la supervivencia de la línea celular en momentos de privación de dicho nutriente en el medio de crecimiento. Mediante el proceso de transfección se puede introducir en las células un vector que codifique para la GS y la selección se realiza empleando MSX, de modo que las células que no hayan incorporado el vector de interés mueren durante el proceso de selección. En este caso no se requieren rondas de amplificación [12, 26].

La principal desventaja de estas metodologías radica en que requiere de aproximadamente 5 rondas de selección por lo que la generación de la línea celular puede llevar más de un año.

4.2. Modificaciones sitio-dirigidas

Como se mencionó, la integración del TG en el genoma de una célula es un evento generalmente aleatorio. La posibilidad de contar con una metodología que logre insertar un gen de interés en una región activa y estable del genoma (generalmente sitios conocidos como “*hotspots*”) llevó al desarrollo de la tecnología de

intercambio de casetes (RMCE, *Recombinase Mediated Cassette Exchange*). Esta estrategia permite sortear el efecto de posición y así alcanzar niveles elevados de expresión de la proteína codificante. El intercambio de casetes es mediado por una recombinasa que permite llevar a cabo el intercambio de dos secuencias de ADN entre el genoma celular y un plásmido que contiene el TG de interés. Esta recombinasa reconoce secuencias heteroespecíficas de ADN, de manera que la reacción entre cada una de las secuencias mencionadas será independiente, evitando reacciones cruzadas y permitiendo la integración de una secuencia de ADN en un sitio específico del genoma [25, 32, 33].

Otros métodos de ingeniería que permiten insertar un TG de interés en un sitio específico del genoma es la tecnología de nucleasas con dedos de zinc (*Zinc Finger Nucleases*, ZFNs). Las mismas son enzimas de restricción creadas a partir de la fusión del dominio dedo de zinc de unión al ADN, que reconoce trinucleótidos específicos, con un dominio de ruptura de ADN. La más comúnmente utilizada es la nucleasa *FoKI*. Una de las ventajas que presenta este sistema es su especificidad de unión, ya que para que *FoKI* produzca la escisión del ADN debe dimerizarse; por lo tanto, es necesario un par de ZFNs para que se reconozcan sitios de ADN. Sin embargo, una de las principales desventajas es que las ZFNs son difíciles de modificar, requiriendo un alto nivel de conocimientos técnicos. Otro sistema son las proteínas TALENs (*Transcription Activator Like Effectors Nucleases*). Son sistemas originalmente caracterizados en *Xanthomonas*, en donde las proteínas TALEs son secretadas cuando infectan una gran variedad de plantas activando en éstas genes que ayudan a la patogénesis. Se pueden generar secuencias personalizadas de TALEs para reconocer sitios específicos del genoma a las que se fusiona la nucleasa *FoKI* para generar el dímero funcional de corte. Son más sencillas de modificar que las proteínas ZFNs. Sin embargo, dado que son de mayor tamaño, su integración génica es menos eficiente, y a su vez, al ser de origen bacteriano pueden desencadenar una respuesta inmune. Un tercer sistema que actualmente ha reemplazado a los anteriores es la tecnología CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)-CAS. Los CRISPR han sido encontrados en el 40% de las eubacterias y 90% de las arqueas secuenciadas. Es un “sistema inmune” de las bacterias que les permite defenderse del ataque de bacteriófagos. El sistema CRISPR se compone de dos partes, un componente proteico CAS9 con actividad de nucleasa y un ARN guía que brinda especificidad al sistema. Al igual que en los sistemas anteriores, la edición con CRISPR puede emplearse para generar mutaciones puntuales, deleciones o inserciones [29, 34].

4.3. Transferencia de genes mediante el empleo de vectores lentivirales

Otra metodología para la transferencia del material genético es la utilización de vectores virales recombinantes. Los vectores lentivirales (LVs, *lentiviral vectors*), miembros de la familia *Retroviridae* (retrovirus) se utilizan ampliamente en investigación y como vectores en terapia génica, debido a su capacidad de transducir tanto células en división como quiescentes, integrándose en regiones de la eucromatina, además de presentar un elevado tropismo hacia distintos tipos celulares [35].

Los LVs han sido construidos a partir de diversos tipos de lentivirus, siendo el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) el más estudiado y utilizado en la actualidad. Inicialmente, el empleo de LVs requería de la implementación de diversas medidas de seguridad debido a la posible generación de partículas lentivirales competentes replicativas (RCLs). A los fines de minimizar el riesgo de formación de dichas RCLs y mejorar su eficiencia se han desarrollado varias “generaciones” de vectores lentivirales [36] (Figura 3). Desde la primera generación de LVs utilizados en estudios de terapia génica hasta la actual tercera generación, se han ido removiendo genes accesorios y regulatorios dispensables para el ensamblado de la partícula, como así también se han ido separando las secuencias estructurales en distintos plásmidos, buscando disminuir al mínimo la probabilidad de recombinación y posible generación de un nuevo microorganismo [37].

El sistema de LVs de tercera generación está conformado por dos partes principales: el vector de transferencia, el cual posee el TG de interés, y el sistema de empaquetamiento. En el vector lentiviral, también denominado plásmido de transferencia, se encuentran todas las secuencias necesarias para la expresión del TG de interés, como así también las secuencias *cis*-actuantes requeridas para el correcto ensamblado del vector lentiviral (LVs) [38, 39]. A continuación se detallan las regiones más importantes:

LTR (*long terminal repeats*): son regiones ubicadas en cada uno de los extremos del ADN proviral, encargadas de actuar como promotores y/o *enhancer* de la transcripción del ARN lentiviral. La región 5'LTR fue modificada, intercambiando el promotor dependiente de *tat* original del HIV-1 por un promotor constitutivo del virus del sarcoma de Rous. La región 3'LTR fue mutada, con el objetivo de generar de esta forma un vector auto-inactivante (SIN, *self-inactivating vector*).

Psi (ψ): secuencia de empaquetamiento, requerida para la incorporación del ARN genómico a las partículas virales.

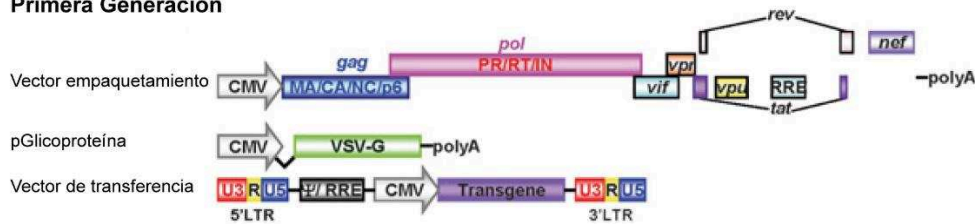
RRE (*Rev response element*): región que posee la secuencia requerida para la unión de la proteína Rev, la cual promueve la exportación del ARN del núcleo al citoplasma.

cPPT (*central polypurine tract*): región rica en purinas que promueve la retrotranscripción viral cuando las partículas lentivirales transducen una célula.

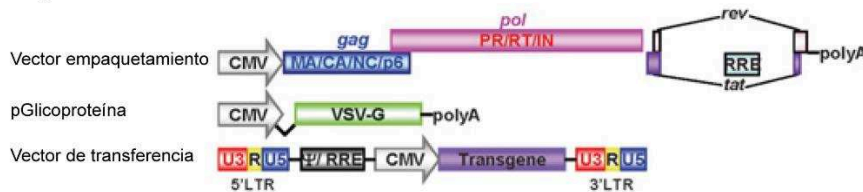
CMV: promotor constitutivo del citomegalovirus. Este es uno de los promotores mayormente utilizados pero puede ser reemplazado por otros promotores para células eucariotas.

WPRE (*woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element*): región estabilizadora del ARN mensajero.

Primera Generación



Segunda Generación



Tercera Generación

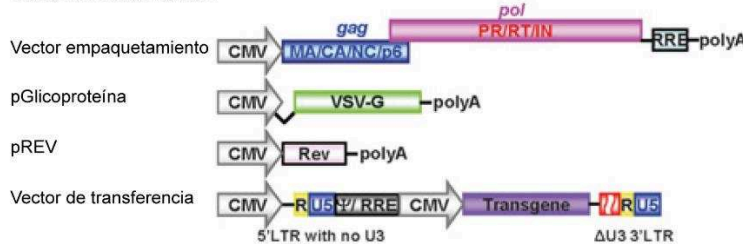


Figura 3. Primera, segunda y tercera generación de vectores lentivirales. La primera generación de vectores lentivirales contiene los genes estructurales gag y pol y demás genes accesorios del HIV-1. La glicoproteína de envoltura se reemplazó por la del VSV, que le confiere la habilidad de transducir un amplio rango de células de mamíferos. Además, las señales de empaquetamiento (Ψ), LTRs y el elemento de respuesta a REV deben estar junto al transgén de interés. En la segunda generación de vectores se removieron gran parte de los genes accesorios para incrementar su seguridad. En la tercera generación se desarrollaron los vectores SIN, incrementando aún más la seguridad de este sistema, el cual consta de cuatro plásmidos conteniendo los genes gag y pol, VSV-G, el elemento de respuesta a Rev y el transgén de interés. (Figura modificada de Sakuma y col., 2012) [39].

Por otro lado, se encuentran los vectores plasmídicos que portan las secuencias codificantes de las proteínas que serán expresadas en *trans* y son necesarias para que el ARN lentiviral sea ensamblado. En el sistema lentiviral de tercera generación los vectores utilizados son los siguientes:

pMDLg/pRRE: posee la secuencia codificante de la poliproteína de cápside (Gag) y la secuencia de la retrotranscriptasa viral (Pol).

pRSV-REV: contiene la secuencia de la proteína Rev, la cual tiene capacidad de unirse a las secuencias RRE, presentes tanto en pMDL/pRRE como en pLV, y promover su exportación desde el núcleo al citoplasma de la célula transducida.

pGlicoproteína: este vector posee la secuencia codificante para la glicoproteína de envoltura necesaria para que la partícula sea capaz de transducir las células blanco. Generalmente, la proteína más utilizada es la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) codificada en el vector pMD.G, debido a su amplio tropismo celular y a su elevada estabilidad.

La transfección de células HEK293 o HEK293T/17 con estos cuatro plásmidos y su correcta recombinación permite llevar a cabo el ensamblado de LVs [40, 39]. Asimismo, la ausencia de RCL en muestras de producción de lentivirus a gran escala conteniendo $1,4 \times 10^{10}$ unidades de transducción (UT) permitió sustentar la elevada seguridad de los LVs de tercera generación [41, 42].

5. Glicosilación proteica y calidad del producto

Como se mencionó en apartados anteriores, otro punto de control para el desarrollo de una proteína terapéutica es su glicosilación. Más de dos tercios de los bioterapéuticos empleados en la actualidad constituyen proteínas recombinantes glicosiladas, en las cuales los glicanos presentan roles importantes que influyen sus propiedades terapéuticas [43]. De este modo, las agencias regulatorias exigen a las compañías farmacéuticas caracterizar y mantener los atributos de calidad del producto (incluyendo la glicosilación) dentro de ciertos límites de aceptación. La FDA, EMA y la Conferencia Internacional de Armonización (*International Conference on Harmonization*, ICH) proporcionan documentos guías sobre los requisitos necesarios para la producción de proteínas terapéuticas. Los rangos de aceptación del perfil de glicosilación dependen de la proteína ya que no existe un límite de aceptación universal. Sin embargo, se debe proporcionar para la comercialización del lote de material. Si se producen cambios durante un proceso de producción de un bioterapéutico, se requieren análisis de comparabilidad rigurosos de manera de

asegurar que dichas modificaciones no alteren la seguridad, identidad, pureza o eficacia del mismo. A manera de ejemplo, se puede citar el caso de Myozyme (Genzyme), en el cual la empresa no fue capaz de demostrar a la FDA que un cambio en la escala de producción en un biorreactor de 160 l a 2000 l, no alteró el perfil de glicosilación de la enzima, debiendo comercializarse como dos productos diferentes [13].

La glicosilación es específica de la especie, tejido y tipo celular empleado, pudiendo incluso variar de un clon a otro dependiendo del medio de cultivo utilizado durante la fermentación, la productividad y el estado fisiológico de la célula [44]. Asimismo, depende de factores tales como las fluctuaciones de los diferentes parámetros en la fermentación (pH, temperatura, agitación, entre otros). Una proteína que normalmente se encuentra glicosilada y permanece activa aún sin estarlo, se puede producir en bacterias. Un ejemplo de ello lo representa el interferón γ . Mientras que en aquellos casos en los que la glicosilación es necesaria para garantizar la estabilidad y un adecuado plegamiento proteico se pueden emplear distintos sistemas de expresión como se ha descrito previamente. La glicosilación determina la velocidad de reacción (en el caso de trabajarse con una enzima), solubilidad, vida media en suero, farmacocinética y farmacodinamia, estabilidad térmica, inmunogenicidad y unión a receptor [1].

5.1. Glicosilación. Vía metabólica

La glicosilación es un proceso metabólico complejo que ocurre a través de un enlace *N*-glicosídico con un grupo R del residuo de Asn presente en la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr (donde X puede ser cualquier aminoácido a excepción de Pro o Asp) o bien, a partir de un enlace *O*-glicosídico de una *N*-acetil-galactosamina con el grupo R de una Ser o Thr. Mientras que la *N*-glicosilación se inicia en el retículo endoplasmático (RE), es difícil de predecir el sitio de inicio de la *O*-glicosilación al no existir una secuencia consenso [44].

La *N*-glicosilación se caracteriza por la transferencia en “bloque” de las cadenas de polisacáridos, así como la adición y remoción de monosacáridos de manera secuencial, lo que depende de la accesibilidad al sitio de reacción, la especificidad del sustrato y la localización espacial de las diversas enzimas y sustratos necesarios para que la reacción ocurra en un orden en particular. Específicamente, el precursor de glicanos consiste en el lípido dolicol fosfato (Dol-P) unido a 14 monosacáridos ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$). Su síntesis se inicia en el lado citosólico de la membrana del RE y comienza mediante la unión a 2 GlcNAc (*N*-acetilglucosamina) y 5 Man (Manosa). Este complejo, denominado $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-Dol}$, se transloca hacia el lumen del RE, donde

se adicionan 4 Man y 3 Glc para así completar la síntesis del precursor. Posteriormente, el mismo es transferido en forma de “bloque” al residuo de Asn correspondiente por acción de un complejo de proteínas de transmembrana denominado oligosacaryltransferasa (OST) [45]. El precursor ya unido a la proteína sufre algunas modificaciones en el lumen del RE. Inicialmente las glucosidasas I y II remueven los 3 residuos de Glc (Glucosa) terminales de manera secuencial para obtener $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. Este procedimiento está relacionado con el control de calidad del plegamiento de la proteína y permite retenerla en el RE. Posteriormente actúa una endomanosidasa que permite generar la estructura $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$. De este modo, la glicoproteína (en su conformación nativa) es liberada del RE y se dirige al cis-Golgi, donde los *N*-glicanos sufren una serie de procesamientos llevados a cabo por α -manosidasas de tipo I (actúan específicamente sobre residuos de Man con enlaces $\alpha 1,2$). Este procesamiento generalmente resulta en el glicano $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, que constituye el sustrato para su diversificación en el Golgi [45]. La diversificación de la estructura glicosídica $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ permite obtener diferentes tipos de *N*-glicanos, que se caracterizan por presentar el mismo *core* formado por 2 residuos de GlcNAc y 3 residuos de Man. Este procedimiento comienza con la adición de una GlcNAc en enlace $\beta 1,2$, catalizada por la enzima GlcNAc transferasa I. Seguidamente la enzima α -Manosidasa II conduce a la remoción de una Man en unión $\alpha 1,3$ y de otra en unión $\alpha 1,6$. De este modo, se obtiene la estructura $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$. La acción de la GlcNAc transferasas II, III y IV conduce a la adición de residuos de GlcNAc. Estos residuos pueden ser extendidos mediante el agregado de galactosa (Gal) y ácido siálico, para lo cual participan enzimas galactosiltransferasas y sialiltransferasas.

Existen tres tipos de *N*-glicanos (Figura 4. A): alta manosa, híbrido y complejo, los cuales comparten un mismo *core* (Figura 4. B). Los glicanos de alta manosa se caracterizan por presentar entre 2 y 6 residuos de Man adicionales unidas al *core* (pudiendo tener manosas fosforiladas en el carbono 6) (Figura 4.C). El tipo complejo no posee manosas adicionales y presenta 2 o más ramas conteniendo GlcNAc (unidas al *core*), Gal y ácido siálico. El tipo híbrido posee una rama de tipo alta manosa y una rama de tipo compleja. Tanto los *N*-glicanos híbridos como complejos pueden ser bi-, tri- o tetra-antenarios, de acuerdo al número de ramas que posean (la GlcNAc es la responsable de determinar el grado de antenaridad). La adición de un residuo GlcNAc a la Man central del *core* constituye la estructura GlcNAc bisectante (Figura 4. D) [45, 46].

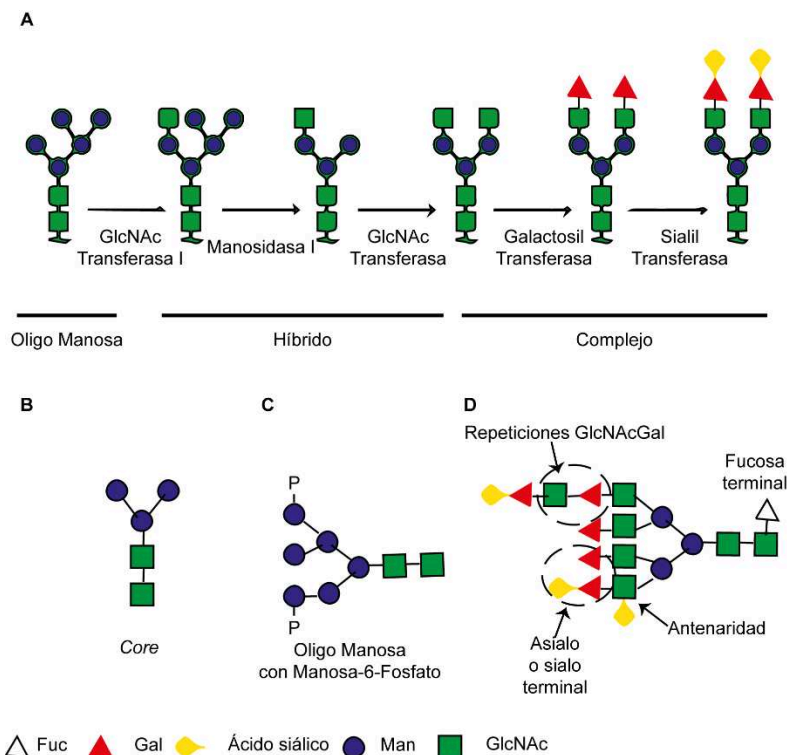


Figura 4. Representación de la diversificación de glicanos (A). Representación del core (B). Representación de los glicanos de oligo manosa con fosfato en el átomo de carbono 6 (C). Representación esquemática de las diferentes modificaciones presentes en un oligosacárido (D). (Figura modificada de Higgins y col., 2010; Costa y col., 2013) [45, 47].

Como se indicó previamente, los *N*- y *O*- glicanos han demostrado ejercer un gran efecto en la inmunogenicidad, eficacia, solubilidad, y vida media de un bioterapéutico. Es por ello que el estudio de la secuencia de los glicanos (microheterogeneidad) y el grado de ocupación de los sitios potenciales de glicosilación (macroheterogeneidad) permite determinar la eficacia de un terapéutico sobre la base de sus propiedades inmunogénicas y su farmacocinética. Se ha comprobado que el contenido de ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac) terminal de una glicoproteína determina su vida media en circulación, por lo que es un atributo de calidad típico a ser considerado durante la evaluación de un terapéutico. Las glicoproteínas no sialiladas son rápidamente removidas de circulación por unión al receptor de asialo-glicoproteínas (ASGPR) del hígado. La proteína EPO recombinante, por ejemplo, tiene una vida media en plasma de ratón de aproximadamente 5 a 6 h si se encuentra sialilada, mientras que si no lo está la misma se reduce a menos de 2 min [13].

Por otro lado, el ácido *N*-glicolilneuramínico (Neu5Gc) es un derivado del Neu5Ac presente en células animales pero no en humanos, por no contar estos últimos con las enzimas requeridas para su síntesis. Si bien es incorporado con la dieta, se ha demostrado que dicho derivado es antigénico. Dentro de diferentes

proteínas recombinantes, la EPO contiene bajos porcentajes de Neu5Gc (1% del total de ácido siálico), mientras que la fetuína contiene niveles de hasta 7% de Neu5Gc, pudiendo desencadenar una respuesta inmune [48].

Los residuos de Man y GlcNAc también pueden modular la eficacia y farmacocinética de un bioterapéutico. Las células *natural killer* (NK) y los macrófagos contienen receptores de Man que los reconocen como un inmunógeno. De igual manera, las glicoproteínas conteniendo GlcNAc y Man terminales son removidas mediante el sistema retículo-endotelial que contiene diferentes receptores de alta afinidad por estos monosacáridos terminales [13].

5.2. Factores externos que influyen la glicosilación de proteínas

a) *Línea celular*: comprender cómo una determinada línea celular puede modificar el perfil de glicosilación es un aspecto clave para el desarrollo de una nueva proteína terapéutica. Las células CHO constituyen la principal línea celular empleada en la generación de proteínas glicosiladas, y en menor medida células HEK293, células de mieloma de ratón SP2/0, HT-1080 humanas, linfoblastos humanos y NS0 [43, 49]. Como se mencionó, el perfil de glicosilación puede variar entre células de diferentes tejidos de un mismo organismo, pudiendo incluso variar de un clon a otro.

b) *Sistema de cultivo*: el proceso de producción utilizado influencia en gran medida el perfil de glicosilación; los tres sistemas de producción más utilizados son *batch*, *fed-batch* y perfusión (continuo). Lipscomb y col. (2005)[50] compararon el perfil de glicosilación de la proteína SEAP (*secreted alkaline phosphatase*) expresada en células CHO DG44 utilizando sistemas de cultivo *batch*, *fed-batch* y perfusión entre líneas celulares que no fueron sometidas a un proceso de amplificación de la expresión y otras que fueron amplificadas mediante metotrexato. La proteína producida por las líneas celulares sometidas a procesos de amplificación presentó un menor porcentaje de manosilación con respecto a la derivada de las líneas no amplificadas, así como también un menor contenido de ácido siálico. Sin embargo, sólo fue un 10% menor, observándose un mayor contenido de ácido siálico en el sistema de perfusión que en el sistema *batch*, lo que puede atribuirse a que las células en un cultivo en modo continuo crecen a menor velocidad que en el cultivo *batch*.

Por otro lado, los diferentes parámetros del cultivo pueden influenciar el perfil de glicosilación. Los niveles de oxígeno disuelto (OD) deben ser monitoreados permanentemente; se ha demostrado que condiciones de hipoxia pueden alterar los niveles de galactosilación terminal. Los iones amonio se acumulan en el medio de cultivo como consecuencia del metabolismo de la Gln y Asn y generalmente ejercen un efecto tóxico hacia la célula. El cloruro de amonio aumenta el pH intracelular

reduciendo el porcentaje de sialidación terminal. Se ha demostrado que una reducción de la temperatura del cultivo incrementa la productividad prolongando la viabilidad celular, lo que, a su vez, favorece el proceso de glicosilación. Una disminución en la velocidad específica de crecimiento celular generada por suplementación con butirato de sodio o disminución de la temperatura resulta en un aumento del grado de ocupación de sitios [46].

c) *Medio de cultivo*: un medio de cultivo se halla constituido por componentes definidos y no definidos, como hidrolizados y peptonas, que pueden ejercer un efecto en el perfil de glicosilación. Se demostró que un anticuerpo monoclonal IgG1 producido en cultivo de hibridomas libre de suero exhibió un mayor contenido de Neu5Ac y Gal terminales en comparación con el mismo obtenido a partir de cultivos que empleaban suero. Algunos componentes definidos del medio como la Glc y Gln también pueden condicionar el perfil de glicosilación: un bajo nivel de ocupación de glicanos puede relacionarse con una disminución de UDP (uridina difosfato)-GlcNAc intracelular en cultivos limitados de glucosa y glutamina. El empleo de suplementos lipídicos y *carriers* también puede mejorar el grado de ocupación de los *N*-glicanos [13].

6. Aplicación de enzimas como productos biofarmacéuticos

Las enzimas son moléculas biológicas que catalizan o aceleran reacciones químicas, biológicas o metabólicas. En ausencia de las enzimas, las reacciones bioquímicas ocurrirían a una velocidad de reacción mucho menor. Una actividad enzimática es esencial para mantener y renovar células y tejidos ya que integran redes de reacciones bioquímicas que regulan la síntesis, reparación y metabolismo del ADN, ARN y proteínas [51].

La aplicación de la tecnología de enzimas al área de investigación farmacéutica y desarrollo es un campo en continuo crecimiento. En los años setenta las enzimas utilizadas comercialmente se obtenían a partir de fuentes animales o vegetales. Dentro de los principales inconvenientes que existían en dicha época se encontraban la baja disponibilidad y los altos costos de producción, lo que se solucionó gracias al desarrollo de la industria microbiana, ya que era posible obtener enzimas de manera más simple y rápida que a partir de fuentes naturales. Los microorganismos pueden manipularse genéticamente, obteniendo así altos rendimientos y calidad adecuada. Dentro de los principales usos industriales de las enzimas se puede mencionar (1) Amidase de *E. coli* para producir 6-aminopenicilánico (6-APA); (2) Xilosa isomerasa de *Streptomyces* para isomerizar D-glucosa a D-fructosa y (3) Nitrilo hidratasa de *Pseudomonas chlorapis* para producir acrilamida de acrilonitrilo. Las enzimas también

juegan un papel clave en la catálisis de reacciones que conducen a la formación microbiana de antibióticos y otros metabolitos secundarios. Asimismo, muchas enzimas son usadas como agentes terapéuticos [1]. En 1987 la entidad estadounidense FDA aprobó la primera enzima recombinante (Activase®), empleada para el tratamiento de ataques cardíacos causados por un coágulo que bloquea las arterias coronarias. En 1990, la FDA aprobó Adagen®, la primer enzima recombinante en el marco del Acta de Drogas Huérfanas (*Orphan Drug Act*). Asimismo, Ceredase® (Imigluserase), desarrollada para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher, constituyó la primer terapia de reemplazo enzimático (TRE) para el cual una enzima exógena fue sitio-dirigida al compartimento celular correcto (1994) [10, 52].

6.1. Costos y regulación vigente de drogas huérfanas

Generalmente se cree que el desarrollo de drogas huérfanas, es decir, aquellos productos medicinales destinados al diagnóstico, prevención o tratamiento de enfermedades crónicas o muy serias, poco frecuentes o raras, implica un costo total menor que en el caso de otros bioterapéuticos porque para su aprobación se requiere un menor número de ensayos clínicos y son sujetas a estándares regulatorios diferentes. Sin embargo, el desarrollo de todo proceso biotecnológico demanda altos estándares de control de calidad y reproducibilidad que garanticen un producto final eficaz y seguro, cumpliendo con los estándares regulatorios vigentes. Esto se complejiza aún más en el caso del desarrollo de drogas huérfanas debido a la falta de información respecto a las características clínicas, etapas y el curso normal de la enfermedad. Asimismo, aunque algunas de las enfermedades raras suelen tener una sintomatología característica, mucha de estas enfermedades suelen ser síndromes con sintomatología idéntica a otras patologías. Por este motivo, avances relativos a comprender el mecanismo de acción de la enfermedad permiten mejorar el diagnóstico antes o durante el desarrollo del tratamiento (el promedio de tiempo entre la aparición de los primeros síntomas clínicos y el diagnóstico correcto oscila entre los 5 a 30 años, dependiendo de la enfermedad). Esto a su vez agiliza la identificación de los pacientes a los cuales será destinada la nueva terapia a desarrollar. A manera de ejemplo, se puede citar los costos del desarrollo de *Alglucosidase*, empleado para el tratamiento de la enfermedad de Pompe, los cuales superaron los 500 millones de dólares a final del 2004 [53].

En este contexto, diversos países desarrollados generaron un marco normativo para alentar a las empresas a desarrollar medicamentos para tratar enfermedades raras (ER) y desatendidas (enfermedades huérfanas). En el año 1983 se aprobó en Estados Unidos el Acta de Drogas Huérfanas. Los medicamentos aprobados bajo el

estatuto de Drogas Huérfanas reciben una exclusividad en el mercado de 7 años. Paralelamente, en Japón (1993), en Australia (1998) y en la Unión Europea (2000) se desarrollaron legislaciones comparables que prevén similares incentivos y protecciones [51, 53]. En el año 2013 se produjo una última enmienda del Acta de Drogas Huérfanas. Esto parece haber satisfecho una necesidad real, ya que el 50% de las proteínas terapéuticas aprobadas (31 de 62) han obtenido la designación de “huérfana” [54].

Estados Unidos ofrece el estatus de huérfano a los fármacos y productos biológicos que se definen como destinados al tratamiento seguro y eficaz, el diagnóstico o la prevención de las ER que afectan a menos de 200.000 personas. En el caso de Japón el número es de 50.000, mientras que para Australia de 2.000. Estas cifras se refieren a los tamaños de la población de esos países variando entonces entre 1 a 8 cada 10.000 habitantes. La Comunidad Europea define a la enfermedad huérfana como aquella cuya frecuencia es menor a 5 cada 10.000 habitantes. La Organización Mundial de la Salud (OMS) propone una frecuencia de 6,5 a 10 cada 10.000. Simultáneamente, Estados Unidos estableció estímulos o incentivos para el desarrollo de estos medicamentos en forma de créditos fiscales y ayudas de investigación, simplificando el proceso de registro y autorización, o bien otorgando la comercialización y exclusividad en el mercado por un lapso de tiempo [55].

En nuestro país, la prevalencia en la población de estas enfermedades es de 1 en 2.000, las cuales han sido denominadas, en el marco de la Ley 26.689/2011, como Enfermedades Poco Frecuentes (EPF). Asimismo, según la disposición de la ANMAT 4.622/12, aquellas enfermedades crónicas, caracterizadas por ser debilitantes, enfermedades severas o con riesgo de muerte para las cuales no existen tratamientos efectivos disponibles, se las ha categorizado como Enfermedades Serias (ES). En 2011 se sancionaron dos leyes relativas a esta problemática: Ley 26.689, para el cuidado de las personas con EPF y Ley 26.688, que declara de interés nacional la investigación y producción pública de medicamentos, materias primas, vacunas y productos médicos. A partir del 7 de agosto de 2012, bajo el marco de la Ley 26.689, los medicamentos destinados a la prevención, diagnóstico y tratamiento de las EPF o ES pueden ser inscriptos en el Registro de Especialidades Medicinales de la ANMAT. Sin embargo, a diferencia de otros países, no existen incentivos de tipo regulatorio, económico o comercial [55].

Por otro lado, la FDA fortalece la comunicación con las compañías farmacéuticas y aprueba medicamentos para satisfacer necesidades médicas no cubiertas utilizando programas flexibles de desarrollo clínico para determinar calidad, seguridad y eficacia, particularmente en la aprobación de medicamentos para enfermedades raras. Los

programas agilizan la revisión regulatoria de medicamentos mediante la vía rápida, *fast track*, revisión prioritaria o aprobación acelerada que se otorga a medicamentos que ofrecen la posibilidad de lograr importantes avances en el tratamiento de una enfermedad, o que permiten implementar un tratamiento cuando no existe una alternativa terapéutica adecuada. La aprobación acelerada se otorga condicionada a que los patrocinadores realicen ensayos clínicos luego de su comercialización para comprobar el beneficio clínico esperado. Si los ensayos clínicos no lo demuestran, la aprobación es revocada [55]. Asimismo, en el caso de la Unión Europea existen dos instrumentos jurídicos similares, uno de éstos se denomina “circunstancias excepcionales” y rige para aquellas condiciones clínicas desconocidas o enfermedades raras. El otro es la “autorización condicional”, que es aquella en la que se observa que los beneficios del medicamento sobrepasan a los riesgos y existe un compromiso para completar el desarrollo de los estudios clínicos [52, 56].

7. Enfermedades lisosomales

A partir del descubrimiento y caracterización inicial de los lisosomas por parte de Robert Wattiaux y Christian de Duve en 1955, el estudio de esta organela ha cobrado interés en las dos últimas décadas, fundamentalmente, debido a su rol crucial en la homeostasis fisiológica [57].

El lisosoma es una organela intracelular de simple membrana que representa aproximadamente un 5% del volumen intracelular, cuyo pH interno es ácido (pH 4-5), conteniendo un amplio espectro de enzimas hidrolíticas tales como las glicosidasas, proteasas, sulfatasas, lipasas y fosfatasas, responsables de la degradación intracelular de la mayor parte de las macromoléculas. Las enzimas hidrolasas, en conjunto con un número de proteínas integrales de membrana, transportadores y motivos *targets* son responsables de diversos mecanismos de recirculación celular, por lo que alteraciones de cualquiera de estos componentes pueden resultar en una disfunción lisosomal. Esto último da origen a un grupo de desórdenes genéticos conocido como desórdenes de depósito lisosomal que engloba un grupo de 50-60 desórdenes genéticos. A manera de ejemplos se pueden citar alteraciones en la exocitosis lisosomal (Síndrome de Chediak—Higashi), reducción en la actividad catabólica lisosomal (enfermedad de Fabry, enfermedad de Niemann-Pick tip A y B y enfermedad de Gaucher), alteraciones en los mecanismos de transporte lisosomal (síndrome de Griscella y enfermedad de Charcot-Marie—Tooth) o alteración de la proteínas integrales de membrana lisosomal (enfermedad de Danon) [57, 52].

Estas alteraciones metabólicas son un grupo de trastornos hereditarios que presentan un fenotipo clínico muy variado. Generalmente, se heredan de forma

autosómica recesiva, a excepción de la enfermedad de Fabry y la enfermedad de Hunter, que son ligados al cromosoma X en forma recesiva, y la enfermedad de Danon, que es una enfermedad ligada al cromosoma X en forma dominante [58]. Los primeros síntomas se producen en la niñez o adolescencia, acortando la expectativa de vida y provocando grados variables de discapacidad en las personas afectadas. Si bien se caracterizan por alteraciones generalizadas, un órgano o sistema del cuerpo suele estar más afectado que otro. Un alto porcentaje de estos trastornos presentan rasgos distintivos pero las presentaciones atípicas también son comunes, y en todos los casos el diagnóstico debe establecerse bioquímicamente mediante ensayos de medición de la actividad enzimática o por análisis mutacional [9, 52].

Es importante el desarrollo de programas de pesquisa prenatal ya que un diagnóstico temprano permite un tratamiento de mayor eficacia. Los protocolos de diagnóstico prenatal se basan en pruebas moleculares o enzimáticas o análisis ultraestructurales. Asimismo, una vez realizado el diagnóstico, el registro de los pacientes es necesario dado el escaso número de afectados por síndrome. Su propósito principal suele ser documentar la historia natural de la enfermedad, incluyendo sus características, manejo y resultados con o sin tratamiento.

En general, existen dos formas de tratamiento: una no específica, de tipo paliativa, destinada a aliviar el dolor e involucra intervención médica o quirúrgica, como la diálisis o *bypass* cardíaco, y otra específica, que aborda las bases bioquímicas de la enfermedad [58]. En este último caso, no existe un tratamiento específico para todos los desórdenes metabólicos, o bien implican numerosos riesgos o no resultan eficaces una vez que se haya alterado el sistema nervioso central. Sin embargo, la perspectiva de éxito ha ido en aumento conforme se avanza en la investigación y desarrollo de alternativas como el trasplante de médula ósea, TRE o la terapia génica [52].

8. Síntesis y transporte de enzimas lisosomales

Las proteínas lisosómicas solubles se sintetizan como polipéptidos precursores que contienen una secuencia *N*-terminal de 20-25 aminoácidos que dirigen su translocación cotraduccional en el lumen del RE. En concomitancia con la escisión del péptido señal, los oligosacáridos preformados, $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, se unen a aquellos sitios con secuencia consenso *Asn-X-Ser/Thr*. Una vez esto, el oligosacárido preformado unido a *Asn* atraviesa un procesamiento extensivo, iniciado en el ER y que es compartido con aquellas proteínas que seguirán la vía secretoria. Luego, las proteínas lisosomales son transportadas hacia el sistema de membranas del Golgi mediante vesículas, donde los oligosacáridos son cortados o modificados por la adición de residuos de azúcar complejo (*Gal*, *Fuc*, *GlcNAc*, ácido siálico). Asimismo,

aquellos residuos de Man presentes en regiones de alto contenido de Man son modificados por la adición de grupos fosfatos. La formación de residuos de Manosa-6-fosfato (M6P) es catalizada por la acción secuencial de dos enzimas. En primer lugar, una *N*-acetilglucosaminil-1-fosfotransferasa, transfiere *N*-acetilglucosamina-1-fosfato (GlcNAc-1-P) de un residuo UDP-GlcNAc a grupos hidroxilos presentes en el átomo de Carbono 6 de residuos Man (preferentemente en α 1,6- que en α 1,3-), generando uniones fosfodiésteres. En segundo lugar, la enzima *N*-acetilglucosamina-1-fosfodiéster α *N*-acetilglucosaminidasa, presente en la región del trans-Golgi, es la encargada de hidrolizar el residuo GlcNAc-1-fosfodiéster, dejando expuestos los residuos M6P (Figura 5) [59, 60].

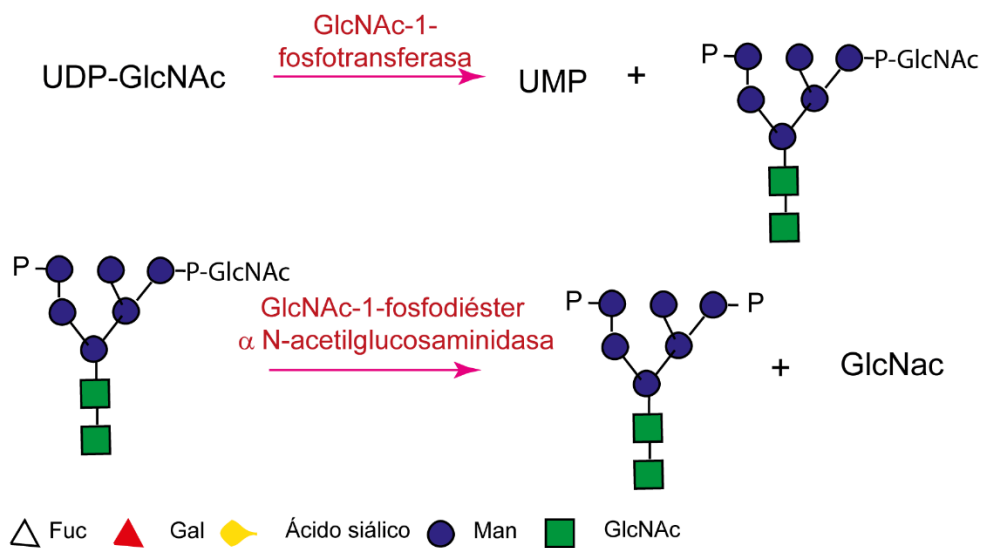


Figura 5. Representación esquemática de la síntesis de residuos M6P.

Durante su transporte a través de la vía biosintética algunas proteínas lisosomales pueden ser sulfatadas en sus oligosacáridos o residuos de Tyr. Finalmente, muchas de estas proteínas atraviesan un procesamiento proteolítico dependiendo del pH, el cual es iniciado por proteasas lisosomales presentes en los endosomas y luego completado por otras en los lisosomas. Este procesamiento se suele asociar normalmente con la conversión a formas proteicas activas y estables.

Algunas de las terapias más importantes disponibles hasta el momento, como lo son la terapia génica o la TRE, son posibles debido a la existencia de la vía del receptor de M6P, la cual posibilita que las enzimas lisosomales (endógenas o exógenas) sean transportadas a través del torrente circulatorio y dirigidas intracelularmente hacia los lisosomas de diversos tejidos [10] (Figura 6).

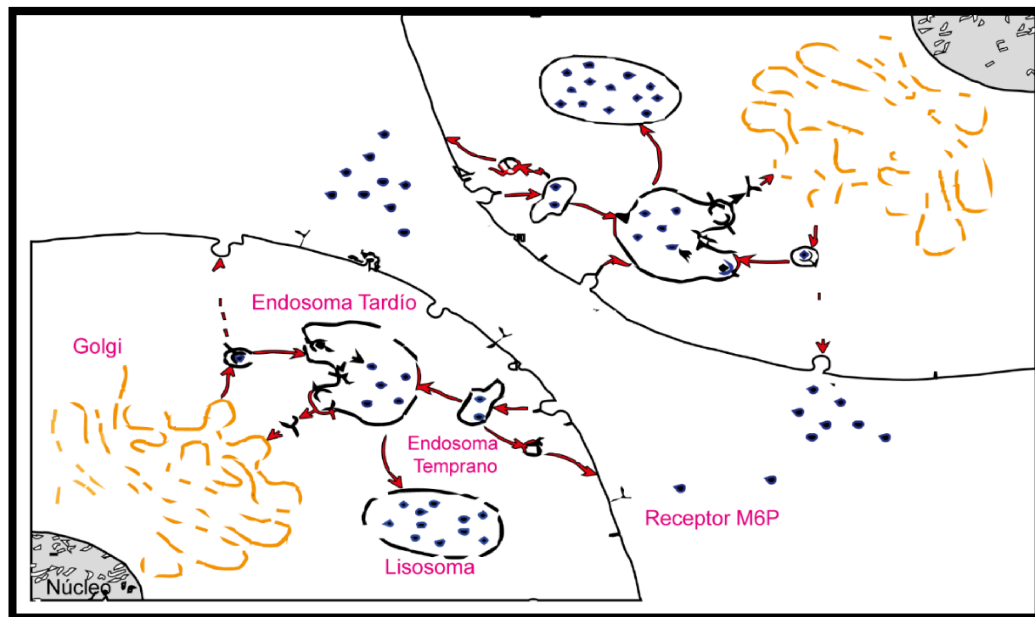


Figura 6. Síntesis y tráfico de las enzimas lisosomales. Gran porcentaje de las enzimas sintetizadas son reconocidas por el receptor de M6P presente en Golgi, el cual las dirige hacia los lisosomas, la localización subcelular final. Una pequeña proporción de las enzimas lisosomales son secretadas hacia la circulación. Aquellas enzimas secretadas o administradas de manera exógena son recapturadas por los receptores presentes en membrana plasmática. (Figura modificada de Wilcox, 2004) [61].

8.1. Receptores M6P

Los residuos M6P pueden ser reconocidos por receptores M6P (RM6P) (Figura 7). Se han logrado identificar dos receptores de M6P: MPR46 o catión dependiente, de 46 KDa, y MPR300 o catión independiente, de 300 KDa, presentes en la región del trans Golgi, endosomas y la membrana plasmática pero no en los lisosomas. Ambos receptores son glicoproteínas de membrana tipo I [10].

Aquellas proteínas que interactúan con los receptores de M6P forman complejos RM6P-ligandos recubiertos de clatrina que salen del Golgi y se fusionan con otras estructuras endosómicas, donde debido al bajo pH de estas estructuras el complejo se disocia, así el receptor puede ser recirculado al Golgi nuevamente.

En células no tumorigénicas alrededor de un 5 a 20% de las proteínas recientemente secretadas escapan de la unión con los receptores de M6P y siguen la vía secretoria. Aproximadamente, entre un 3 a 10% de los RM6P están presentes en membrana plasmática, pero sólo el MPR300 participa del proceso de internalización y redireccionamiento de aquellas proteínas lisosomales que se escaparon de la vía endosómica [59].

Asimismo, se ha reportado la existencia de vías de transporte alternativas y se han identificados otros receptores celulares. La sortilina (receptor de neurotensina 3) es una glicoproteína de membrana tipo I de 95 KDa y ha sido identificada como una de

las mediadoras en el tráfico lisosomal de la prosaposina y la esfingomielidasa ácida [59], así como también de la internalización de la enzima alfa Galactosidasa A (en su forma recombinante), en conjunto con el RMP300, en células endoteliales de riñón [62].

Finalmente, además de la vía endocítica, a partir de la cual es posible el desarrollo de la TRE y de la vía sintética, por el cual los lisosomas o endosomas tardíos reciben material celular proveniente de la región del trans-Golgi, existe un tercer mecanismo por el cual las macromoléculas se dirigen hacia los lisosomas, denominado autofagia. Existen tres tipos de autofagia: macro-, micro- y autofagia mediada por chaperonas. La macro-autofagia es el proceso mediante el cual el citoplasma junto con porciones de organelas son secuestrados en vesículas de doble membrana originando autofagosomas, los cuales al unirse a los lisosomas forman autolisosomas. En este compartimento se lleva a cabo la degradación final y recirculación de diversos componentes celulares. La microautofagia, por el contrario, se origina por invaginaciones de la membrana lisosomal, permitiendo la degradación no sólo de macromoléculas presentes en el citosol sino de mitocondrias y peroxisomas. La autofagia mediada por chaperonas, la cual es la forma de autofagia más selectiva y directa, media el transporte de proteínas citosólicas hacia el lumen lisosomal; es dependiente de proteínas constitutivas como la familia de proteínas de shock térmico de 70 KDa (Hsp70), las cuales están presentes en ambas caras de la membrana lisosomal e interaccionan con proteínas de membrana lisosomal como LAMP-2 [57].

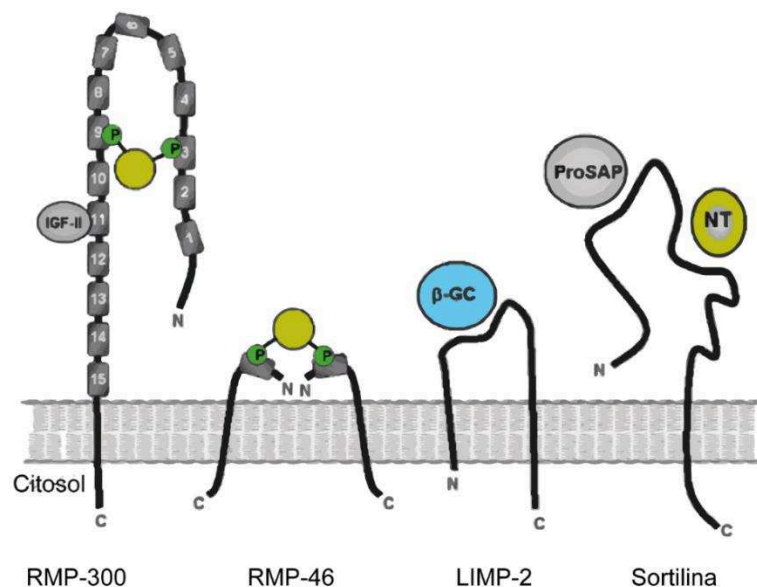


Figura 7. Receptores involucrados en el direccionamiento de las proteínas lisosomales. (Figura modificada de Braulke y Bonifacio, 2009).

9. Enfermedad de Fabry

La enfermedad de Fabry (OMIM 301500) es un desorden metabólico asociado al cromosoma X en forma recesiva descrito por primera vez en 1898 por dos dermatólogos que trabajaban en forma independiente: Anderson, en Inglaterra, y Fabry, en Alemania. Este desorden es producido por una alteración en el catabolismo de los esfingolípidos como resultado de la actividad defectiva de la enzima α -Galactosidasa A, y se caracteriza por el depósito progresivo de residuos α -D galactósidos terminales que forman parte de glicoesfingolípidos neutros (principalmente de Globotriaosilceramida (Gb3)), en los lisosomas de la mayoría de los tejidos viscerales y en los fluidos corporales. La enfermedad de Fabry se caracteriza por dolor crónico, opacidad ocular, insuficiencia renal y hepática, lesiones en la piel, deterioro vascular y deficiencias cardíacas [63].

Esta enfermedad afecta a hombres de todos los grupos étnicos: hombres homocigotos que tienen mínima o nula actividad enzimática exhiben un fenotipo clásico de la enfermedad, caracterizada por acroparestesia, angioqueratomas, hipohidrosis, disfunción renal y opacidad de la córnea. Las principales causas de muerte son debido a complicaciones en corazón, riñón o cerebro, reduciendo la expectativa de vida a 20 años menos en comparación con la población no afectada. Un gran porcentaje de mujeres heterocigotas también son afectadas, aunque la actividad de la enzima es más variable y la progresión de la enfermedad puede diferir del fenotipo clásico. Los primeros síntomas se originan durante la niñez o adolescencia, pudiendo llegar a surgir durante la segunda o tercera década, conocida como variante de inicio tardío, caracterizada por la ausencia de manifestaciones típicas de la enfermedad como angioqueratomas o acroparestesia, afectando principalmente el riñón, corazón o sistema nervioso central [64–66].

9.1. Mecanismo de acción

La acumulación crónica de residuos α -D-galactósidos, en particular Gb3, conduce a un estado de toxicidad permanente. No se ha evidenciado muerte celular pero sí la conversión hacia ciertos tipos celulares. Asimismo, un aumento de los niveles de Gb3 tiene asociado un incremento de las especies reactivas de oxígeno, como peróxido (*ROS, reactive oxygen species*). Los residuos de Gb3, a su vez, inducen la expresión de moléculas relacionadas con una respuesta de tipo inflamatoria e inmune (*ICAMs, intracelular adhesión molecules y VCAM-1, vascular cell adhesión molecule-1, E-Selectin*) [67].

Además de niveles incrementados de Gb3, se ha logrado determinar un aumento de la concentración de Lyso-Gb3 (Globotriaosilesfingosina), particularmente en

circulación, el cual actuaría como un potente inhibidor de la actividad de la enzima [67].

9.2. Diagnóstico

Existen signos específicos de la enfermedad como angioqueratomas en la piel, ectasia (dilatación) vascular en la mucosa bucal o conjuntiva u opacidad de la córnea. Otras anomalías no específicas pero de igual importancia son el dolor neuropático, hipohidrosis, insuficiencia renal, anomalías cardíacas o derrame cerebral. El diagnóstico de la enfermedad deberá confirmarse por una reducción de la actividad α -Galactosidasa A en plasma o leucocitos de sangre periférica o en cultivos de fibroblastos de la piel. Como estudio de tamizaje puede realizarse el dosaje de la enzima en gotas de sangre seca en papel de filtro [68, 69]. Generalmente, niveles por debajo del 35% de los valores normales ($4,1-17,4 \text{ U.ml}^{-1}$ en plasma y $34-128 \text{ U.mg}^{-1}$ en leucocitos) debe conducir a la sospecha de la enfermedad [70]. Sin embargo, este análisis es útil sólo en hombres ya que en mujeres heterocigotas, la actividad enzimática se encuentra normalmente reducida o incluso en valores normales debido a una inactivación aleatoria del cromosoma X (hasta el momento se han logrado identificar más de 600 tipos de mutaciones del gen que codifica para la enzima) [71]. Asimismo, las mutaciones pueden ser de distinto tipo: deleciones completas del gen o exones, inserciones, duplicaciones o mutaciones puntuales que provocan cambio de sentido o sin sentido, y que pueden localizarse en cualquiera de los 7 exones [69]. Es por eso que en estos casos es crítico realizar un diagnóstico molecular para identificar la mutación [67].

9.3. Tratamiento

9.3.1. Terapia génica

La terapia génica permite la transducción de células *in vivo* de manera de lograr una secreción continua y prolongada de la enzima. Existen diferentes vectores empleados en esta terapia: vectores de tipo retroviral, adenoasociados, lentivirales o vectores sintéticos. Los primeros intentos de aplicar la terapia génica para el tratamiento de la enfermedad se enfocaron en el empleo de vectores de tipo retroviral empleando un casete bicistrónico con un sitio interno de entrada del ribosoma (IRES), conteniendo la secuencia para un marcador de selección junto con la secuencia codificante de la enzima. La principal limitación de este sistema es la baja expresión del segundo gen (α -Galactosidasa A) ya que el inicio de la traducción está mediada por elementos IRES [72]. Asimismo, los vectores retrovirales tienen una baja eficiencia de transducción y sólo pueden infectar células en división; a diferencia de éstos, los

vectores virales adenoasociados son capaces de transducir células tanto en división como en no división y alcanzar una expresión estable en el tiempo. Inicialmente, se propuso la administración del vector recombinante vía vena portal hepática, logrando correcciones a largo plazo tanto de la actividad enzimática como del almacenamiento glicolípídico en ratones *knockout* [73]. También se propuso la administración directa del vector en células de músculo esquelético de ratón, logrando mejoras en la reducción de los niveles de Gb3 acumulado en comparación con la administración vía vena portal hepática [74]. El empleo de vectores de tipo lentiviral (familia *Retroviridae*) tiene como ventaja la posibilidad de inserción de ADNc de mayor longitud, garantizando una expresión a largo plazo [75]. Por último, el empleo de vectores sintéticos, a diferencia de los vectores virales, tiene la ventaja de no generar una respuesta inmune en el huésped por lo que permite administraciones a repetición y es, a su vez, un sistema más seguro debido a la ausencia de proteínas virales. Sin embargo, se logran niveles de expresión inferiores a los alcanzados con un sistema viral [76].

Otra alternativa es la terapia que plantea el empleo de células hematopoyéticas de un donante sano, pudiendo corregir el defecto enzimático en células neuronales y gliales. Sin embargo, este procedimiento está asociado a numerosas complicaciones con riesgos significativos de fracaso del injerto o con la enfermedad de injerto contra el huésped (GVHD, *Graft-Versus-Host-Disease*), que pueden conducir a la muerte. Este problema puede ser evitado mediante el trasplante de células madre hematopoyéticas autólogas que han sido modificadas genéticamente para expresen la proteína faltante (terapia génica *ex vivo*). Numerosos estudios han sido realizados con éxito en modelos animales. De todas formas, para que esta terapia se convierta en una opción para el tratamiento de pacientes afectados con un trastorno de almacenamiento lisosomal, aún se requieren numerosos estudios que aseguren la eficacia y seguridad de la terapia, y no menos importante, el consenso y la aprobación de comunidad científica y biomédica [52, 77].

9.3.2. *Terapia de reducción por sustrato (depleción o privación)*

La depleción consiste en reducir los niveles de sustrato acumulados, previo a su depósito en las paredes vasculares o en otra localización subcelular. Sin embargo, se ha reportado que luego de 6 meses de tratamiento, los niveles de Gb3 aumentaron inesperadamente, demostrando que este abordaje no es adecuado para fines terapéuticos. Por otro lado, la terapia de privación de sustrato consiste en bloquear la vía de síntesis del sustrato, empleando un potente inhibidor de la enzima glicosilceramida sintetasa, responsable de la síntesis de Gb3. Uno de los inhibidores

más frecuentemente utilizado es el PDMP (*D-Threo-1-Phenyl-2-decanoylamino-3-morpholinopropanol*). Asimismo, existe una serie de homólogos más activos, entre los que se puede mencionar: el *D-t-EtDO-P4 (1-ethylendioxyphenyl-2-palmitoylamino-3-pyrrolidino-propanol)* y el *D-t-pOH-P4 (1-4'-hydroxyphenyl-2-palmitoylamino-3-pirrolidino-propanol)*. El PDMP tiene la desventaja de ejercer un efecto tóxico importante, con afecciones de tipo renal y neurológicas. Se ha demostrado también una disminución en el crecimiento celular acompañado de un incremento en los niveles de ceramida acumulada. En el caso de homólogos a PDMP, existe un amplio espectro de efectos; se ha reportado un efecto inhibitorio de la actividad de la enzima glicosilceramida sintasa empleando concentraciones en el orden de los nanomoles y sólo al emplear concentraciones en el orden de los micromoles se observa un aumento en los niveles de ceramida y un efecto inhibitorio en el crecimiento celular. A su vez, se ha reportado que la administración de D-t-EtDO-P4 a ratones *knockout* bloquea en un modo efectivo a la enzima glicosilceramida sintasa, en un corto plazo, y luego de cuatro semanas, los niveles de Gb3 en riñón se ven reducidos de manera significativa en comparación a ratones control [78].

9.3.3. Empleo de chaperonas químicas

Okumiya y colegas (1995)[79] han reportado que existen ciertas mutaciones del gen de la enzima α -Galactosidasa A que dan lugar a una enzima que es activa pero de menor estabilidad, la cual es degradada en el RE en condiciones fisiológicas normales. Para estos casos se ha planteado como tratamiento el empleo de pequeñas moléculas (galactosa o melibiosa) que se unen al sitio activo de la enzima, estabilizándola y permitiendo su correcto transporte hacia lisosomas [79]. Actualmente, se encuentra en fase clínica III de desarrollo una chaperona química que se une de manera reversible al sitio activo de la enzima, denominada deoxygalactonojirimycin (DGJ, hidrocliclorida *migalastat*, Amicus Therapeutics). Como se mencionó, esta monoterapia representa una alternativa para aquellos pacientes que presentan formas mutadas de la enzima originando un fenotipo menos estable [80].

9.3.4. Terapia de Reemplazo Enzimático

Desde el año 2001, la TRE está disponible para el tratamiento de esta enfermedad. Se encuentran disponibles dos presentaciones comerciales: *agalsidase beta (Fabrazyme®; Genzyme Corporation)* y *agalsidase alfa (Replagal®; Shire Human Genetic Therapies)* [81]. Diferentes estudios han demostrado que ambas preparaciones presentan propiedades bioquímicas idénticas y son comparables respecto a la composición de aminoácidos, actividad enzimática, actividad específica,

estabilidad e internalización de la enzima por parte de cultivo de fibroblastos, presentando mínimas diferencias en su perfil de glicosilación [82, 83]. Sin embargo, han sido aprobadas para el tratamiento de la enfermedad a diferentes dosis clínicas: 0,2 mg.Kg⁻¹ de peso cada semana y 1 mg.Kg⁻¹ de peso cada dos semanas de *agalsidase alfa* y *beta*, respectivamente. Ambas drogas se producen en forma recombinante: *agalsidase alfa* a partir de cultivos de fibroblastos humanos mientras que *agalsidase beta* a partir de células CHO-K1.

Tanto *agalsidase alfa* como *agalsidase beta* han sido declaradas aptas para su comercialización en la UE. Sin embargo, sólo *agalsidase beta* fue aprobada por la FDA. Asimismo, en febrero de 2008, la UE autorizó el uso de Fabrazyme® bajo “circunstancias excepcionales” [64]. La aprobación por parte de los organismos de control se basó en los resultados de ensayos clínicos aleatorizados, controlados con placebo [84].

En nuestro país, la ANMAT en junio de 2005 aprobó el uso de *Agalsidasa beta* (Fabrazyme®) para el tratamiento de la enfermedad de Fabry bajo el registro N° 52.223. Mientras que en 2006 por disposición N° 53.018, aprobó el uso de *agalsidasa alfa* (Replagal).

Actualmente, existe otra versión recombinante, Pegunigalsidase alfa (PRX-102, Protalix, Biotherapeutics) que se encuentra en estadios avanzados de desarrollo (fase clínica III), la cual es una variante pegilada producida en el sistema de expresión en plantas (ProCellEx®) utilizando cultivos celulares de tabaco BY2 [11].

Finalmente, se encuentra en fase clínica III de desarrollo una terapia que combina Migalastat (Amicus Therapeutics) junto con un biosimilar de la enzima *algalsidase beta* producido en Japón (JCR Pharmaceuticals, Kobe, Hyogo, Japon en colaboración con la farmacéutica GlaxoSmithKline), denominado ATB100. Xu y col., (2015)[85] proponen esta alternativa como una coformulación y no como una coadministración, de manera que la chaperona química pueda estabilizar la enzima recombinante antes de ser administrada, reduciendo simultáneamente la dosis requerida de Migalastat en comparación a las aplicadas en una coadministración [85].

9.3.4.1. Efectividad de la TRE

Como se mencionó previamente, para que la terapia sea efectiva es necesario un diagnóstico temprano. Keslová-Veselíková y col. (2008)[86] sugieren la presencia de modificaciones en las membranas de compartimentos lisosomales y endosomales, así como la reducción de RM6P, fundamentalmente en tipos celulares de baja capacidad de regeneración como cardiomiocitos o células musculares lisas, a medida que la enfermedad avanza, lo que explicaría una reducción de la efectividad de la

terapia. Ello también es sostenido por Jaurretche y col. (2017) [87], quienes hacen mención de la irreversibilidad de los daños a medida que la enfermedad progresa.

A continuación se explica brevemente la efectividad de la terapia en distintos órganos.

a) *Riñón.* La disfunción renal es una de las principales complicaciones de esta enfermedad. La etapa final de esta afección es más común en hombres luego de la cuarta década; sólo una pequeña proporción de mujeres heterocigotas desarrollan esta afección. Se caracteriza inicialmente por microalbuminuria o proteinuria, lo que está asociado con un descenso en la tasa de filtración glomerular. La TRE estabiliza la función renal: un estudio realizado a pacientes registrados, 151 hombres y 62 mujeres, tratados con *algasidase beta* durante 2 años, demostró estabilizar la función renal a la mayor parte de ellos. Resultados similares se reportaron en un estudio realizado a 151 pacientes a los que se les administró *algasidase alfa* [88]. Asimismo, como se mencionó previamente, la probabilidad de éxito de la terapia depende del estadio de la enfermedad en que se encuentre el paciente antes de comenzar el tratamiento; así, la iniciación de TRE antes del desarrollo de glomeruloesclerosis significativa y proteinuria puede ser clave para prevenir la futura enfermedad renal en los pacientes [89].

b) *Corazón.* Las afecciones cardíacas son una de las principales causas de muerte prematura. Dentro de las alteraciones más comunes relacionadas a esta enfermedad se pueden mencionar: hipermetropía, arritmia, insuficiencia valvular e hipertrofia ventricular izquierda. La TRE estabiliza los niveles de Gb3 en células endoteliales del miocardio, mejorando la función ventricular izquierda.

c) *Alteraciones neurológicas.* Los pacientes con esta enfermedad experimentan una variedad de síntomas neurológicos, incluyendo dolor neuropático, sudoración alterada y deficiencia auditiva. El derrame cerebral es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad. La TRE reduce principalmente el dolor neuropático.

Una de las principales dificultades que enfrenta la TRE es el desarrollo de formulaciones que permitan incrementar la estabilidad de la enzima recombinante, de manera de garantizar una distribución adecuada hacia todos los órganos y tejidos blancos. La barrera hematoencefálica, dada su permeabilidad altamente selectiva, reducida expresión de receptores y el bajo flujo sanguíneo representa el principal obstáculo de esta terapia [57].

9.3.4.2. *Agalsidasa alfa versus agalsidasa beta*

Probablemente, establecer una comparación de la eficacia entre ambos terapéuticos resulta limitada debido al número reducido de estudios controlados y aleatorizados, diferentes criterios de inclusión de pacientes, heterogeneidad de la enfermedad, ensayos a tiempo reducido y a diferentes dosis. Hasta la fecha, estudios *in vitro* o *in vivo* en ratones no han demostrado diferencias significativas [64]. Sin embargo, Lee y col. (2003) [82] reportan que *algasidase alfa* presenta un menor contenido de residuos M6P en comparación con *algasidase beta*, lo que explicaría, en parte, las diferentes dosis aplicadas en cada caso.

9.3.4.3. *Alteraciones del sistema inmune en pacientes. Inmunogenicidad de la terapia*

Un estudio realizado por Linthorst y col. (2004) [90] a 18 pacientes tratados con *algasidase alfa* o *beta* durante los primeros 6 a 12 meses de tratamiento, reveló la existencia de anticuerpos anti-*agalsidase alfa* y *beta* y que los mismos presentaron reactividad cruzada. En pacientes hombres con una actividad residual de la enzima o pacientes mujeres no se detectó desarrollo de anticuerpos neutralizantes. Lo anterior también fue corroborado por un estudio realizado por Rombach y col. (2012) [91], quienes hicieron hincapié en la importancia de la dosis: la dosis más alta de *agalsidasa beta* condujo a respuestas bioquímicas más robustas. Esto está en línea con un estudio en el que una menor dosis de *agalsidasa beta* (0,3 mg.kg⁻¹) condujo a aumentos de Gb3 en un subgrupo de pacientes. Un informe de la base de datos de vigilancia postcomercialización de la *agalsidasa beta* reportó que de los 571 varones tratados con Fabrazyme®, 73% desarrolló anticuerpos hacia la enzima, y sólo el 11% de estos desarrolló tolerancia inmune durante los primeros 6 a 12 meses de tratamiento. Este efecto se redujo conforme se prolongó el tratamiento en el tiempo [92]. Asimismo, se detectó un aumento de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6), inducido por Gb3 a través de receptores tipo Toll TLR4, viéndose reducido en pacientes en tratamiento de reemplazo enzimático [65, 93].

10. α -Galactosidasa A

La enzima α -Galactosidasa A (EC 3.2.1.22; α -GAL) es una proteína lisosomal de la familia de las hidrolasas ácidas, que cataliza la remoción de los residuos α -D-galactósidos que forman parte de los oligosacáridos, glicoproteínas y glicolípidos durante el catabolismo de las macromoléculas (Figura 8) [94].

La enzima α -GAL humana es una proteína homodimérica de 101 KDa, cuyas subunidades son de aproximadamente 50 KDa. Es una glicoproteína que contiene

alrededor de 5 a 15% de glicanos complejos y oligosacáridos de alta manosa. Las variantes obtenidas a partir de tejidos presentan un punto isoeléctrico (pI) de aproximadamente 4,3 a 5,1, mientras que la variante purificada de plasma tiene un pI de aproximadamente 4,2. Esta heterogeneidad en el pI está determinada principalmente por el porcentaje de ácido siálico: se ha logrado determinar que la variante plasmídica presenta de 10 a 12 residuos de ácido siálico; por su parte, la variante purificada a partir de placenta solo tiene 1 a 2 residuos de ácido siálico [95].

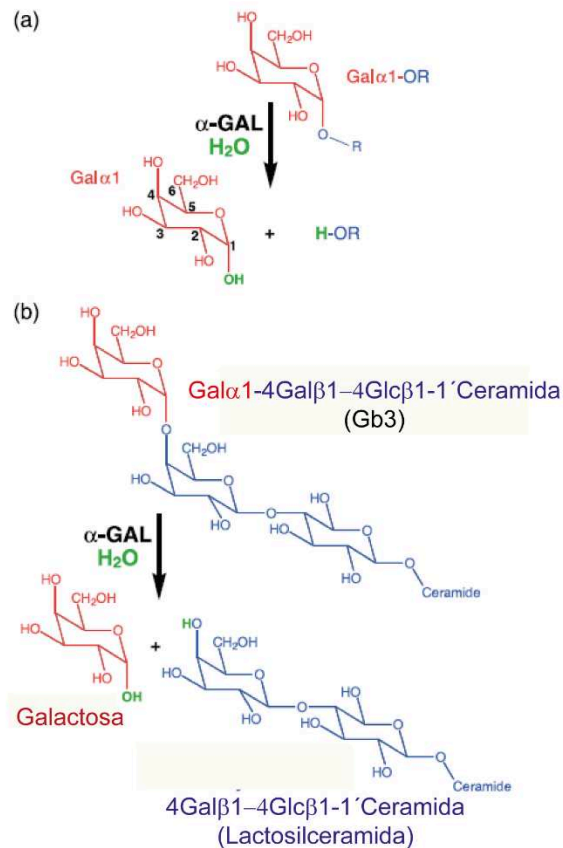


Figura 8. Reacción catalizada por la enzima α -Galactosidasa A. Reacción genérica: una galactosa terminal del átomo de carbono anomérico es escindida de un oligosacárido, glicoproteína, o glicolípido, dando lugar a una α -Galactosa y un grupo alcohol (a). El sustrato acumulado durante la enfermedad de Fabry (Gb3) es escindido, liberando un residuo de α -Galactosa y lactosilceramida. En ausencia de la enzima funcional este sustrato se acumula en los tejidos (b). (Figura modificada de Garman y Garboczi, 2004) [94].

Hacia finales de 1980, el ADNc y la secuencia codificante fueron aisladas y caracterizadas en su totalidad. El ADNc de 1.400 pb contiene la secuencia codificante de un precursor de 429 aminoácidos, incluyendo 31 aminoácidos que contienen el péptido señal, el cual es procesado y modificado en el Golgi y en los lisosomas para dar lugar a la forma madura y activa [96]. Este gen se localiza en la región cromosomal Xq21.33- Xq22 [63].

La estructura de la enzima fue determinada mediante cristalografía de rayos X. Cada monómero presenta 2 dominios, un dominio $(\alpha/\beta)_8$ que contiene el sitio activo y un dominio C-terminal formado por 8 hebras β antiparalelas en dos hojas formando un sándwich tipo β (Figura 9) [94].

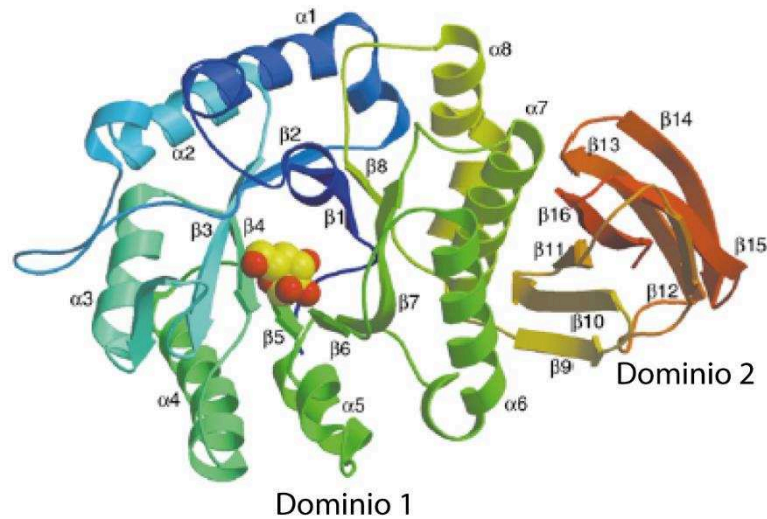


Figura 9. Estructura de la enzima α -Galactosidasa A (monómero). El monómero está coloreado del N-terminal (en azul) al C-terminal (en rojo). La Galactosa (ligando) está representada en átomos rojos y amarillos. (Figura modificada de Garman y Garboczi, 2004) [94].

El péptido señal comprende los primeros 31 aminoácidos, el primer dominio se extiende de los residuos 32 a 300, mientras que el segundo dominio comprende los aminoácidos 331 a 429 [94].

Cada monómero presenta 47 grupos carboxilos y sólo 36 residuos básicos, por lo que a pH neutro se espera que presente una carga neta de -11. Los grupos carboxilos se concentran principalmente próximos al sitio activo; sin embargo, a pH lisosomal muchos de estos grupos se encuentran protonados, reduciendo la carga neta de la molécula. Asimismo, los N-glicanos que forman parte de la enzima son altamente sialilados y fosforilados, localizándose en zonas distales al sitio activo. Cada monómero contiene 4 sitios de N-glicosilación (pero sólo tres de ellos son ocupados: N139, N192 y N215) (Figura 10) y 5 puentes disulfuro intracatenarios (C52–C94, C56–C63, C142–C172, C202–C223 y C378–C382). El cuarto sitio potencial de N-glicosilación es el N408 que contiene la secuencia Asn-Pro-Thr, la cual no es comúnmente reconocida por la maquinaria celular. Los sitios N192 y N215 se caracterizan por presentar oligosacáridos de alta manosa, mientras que el sitio N139 sólo se caracteriza por tener oligosacáridos de tipo complejo. Es decir, que los

N-glicanos unidos a los sitios N192 y N215 son los involucrados en la interacción con los receptores de M6P [94].

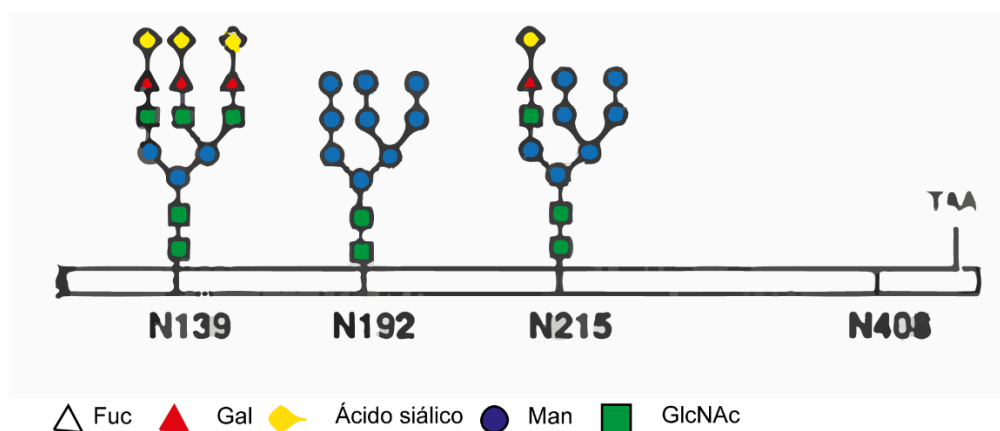


Figura 10. Representación esquemática de la secuencia primaria de α -GAL (monómero). (Figura modificada de Desnick y col.).

Los dos sitios activos que forman parte del homodímero se encuentran a una distancia aproximada de 50 Å de separación. Debido a que ocurren pequeños cambios en la conformación estructural de la enzima unida al ligando y no unida, no se evidencia cooperatividad entre ambos sitios [94]. Sin embargo, Bishop y Desnik (1981) [97] estudiaron las propiedades cinéticas de la enzima α -GAL humana, reportando resultados consistentes con la existencia de cooperatividad entre ambos monómeros. Afirmaron además que su hallazgo sugiere que la actividad enzimática y la estabilidad pueden ser dependientes del grado de dimerización. A su vez, Kizhner y col. (2015) [11] proponen que la variante PRX-102 tiene una mayor estabilidad que *agalsidasa alfa* y *beta* debido a la estabilización de la estructura cuaternaria por parte del polietilenglicol (PEG).

El sitio activo de la enzima está formado por la cadena lateral de 15 residuos: W47, D92, D93, Y134, C142, K168, D170, E203, L206, Y207, R227, D231, D266, M267 y C172 que está unido a C142 mediante puente disulfuro [94].

11. Expresión de α -Galactosidasa A en forma recombinante

Inicialmente, la enzima fue purificada a partir de diferentes tejidos humanos: hígado, bazo, placenta o plasma. La α -GAL obtenida a partir de tejido placentario, administrada por vía intravenosa, demostró una reducción efectiva de los niveles de Gb3. A su vez, aquellas variantes purificadas a partir de bazo y plasma fueron estudiadas como alternativas para ser aplicada en la TRE [95]. Sin embargo, no se demostró la efectividad bioquímica y clínica debido a no contar con cantidades

suficientes de la enzima para ser evaluada en dosis adecuadas y estudios a largo plazo. Como alternativa se propuso la producción de la enzima en forma recombinante.

En la actualidad, las dos variantes comerciales de uso terapéutico son producidas empleando células animales como sistema de expresión heterólogo. En este contexto, se han propuesto otros sistemas de expresión, como *E. coli* [98, 99], *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 [99], *S. cerevisiae* [100], *P. Pastori* [101] o células de insecto [102]. No obstante, estos sistemas requieren la aplicación de extensos procesos de purificación, logrando bajos rendimientos proteicos. Asimismo, si bien estas variantes demostraron ser internalizadas por células de fibroblastos de pacientes, los valores de actividad específica son inferiores a los reportados para las variantes producidas a partir de cultivo de células animales.

De igual manera, como se mencionó, Kizhner y col. (2015) [11] reportaron una variante de la enzima producida en células de tabaco (PRX-102), modificada químicamente tras la adición de una molécula de PEG lo que le otorga mayor estabilidad y vida media en plasma. El perfil de glicosilación obtenido es diferente al de aquellas variantes obtenidas a partir de células animales, caracterizado por presentar, principalmente, estructuras de alta manosa (no fosforiladas) ya que esta variante presenta un péptido C-terminal de retención en RE (KDEL). Kizhner y col. (2015) plantean la existencia de un mecanismo alternativo al de los receptores de residuos M6P que permite la internalización de la proteína recombinante hacia los lisosomas. De manera independiente, Shen y col. (2016) [103] desarrollaron una variante de la enzima producida en musgo (moss- α Gal), la cual también carece de residuos M6P, explicando la internalización hacia lisosomas mediante la presencia de receptores de manosa. Una de las principales desventajas del empleo de plantas como sistema de expresión es la existencia de residuos inmunogénicos como α 1,3-fucosa y β 1,2-xilosa. Kizhner y col., (2015) reportaron la presencia de estos residuos por lo que se deberán realizar estudios de inmunogenicidad para garantizar la seguridad de esta terapia; mientras que en el caso de la variante moss- α Gal, se produjo en una cepa a la cual se le eliminó mediante glicoingeniería las enzimas responsables de sintetizar dichos residuos, por lo que se trataría de una variante más segura.

Por otra parte, se han llevado a cabo diferentes estrategias en busca de optimizar el proceso de producción global de la α GAL recombinante humana (rh α GAL). Este último punto tendrá particular importancia durante el desarrollo de los objetivos de la tesis.

A partir del método de amplificación por metotrexato, se lograron producir niveles de enzima secretada de 7.5 pg.cél⁻¹.día⁻¹(clon AGA5.3) [63, 104]. Por otra parte, Sohn

y col (2013) [105], utilizando el mismo método de amplificación, reportaron el desarrollo de clones de alta productividad (superiores a $150 \text{ mg.l}^{-1}.\text{día}^{-1}$), 30 veces superior a los niveles de productividad logrados en el biorreactor de fibra hueca descrito en la patente para la agalsidasa beta (EP2210947). Sin embargo, la enzima resultante (I303) demostró una sialilación incompleta debido a la brecha entre el alto nivel de producción de proteína y la baja capacidad del proceso de glicosilación que tiene lugar durante la secreción. A pesar de lograr una sialidación completa luego de una reacción enzimática *in vitro*, esta ineficiencia derivó en que este proceso de producción sea más lento, laborioso y costoso, requiriendo un paso adicional para alcanzar el producto final. La expresión génica en modo transitorio se ha propuesto como una estrategia alternativa para obtener rhcGAL en células HEK293 en suspensión [96]. La transfección de células HEK293 ha sido ampliamente utilizada para la producción de proteínas en forma transitoria en pequeña y gran escala, con rendimientos superiores a 50 mg.l^{-1} de proteína recombinante. Sin embargo, la mayoría de las proteínas recombinantes producidas para ensayos clínicos se expresan en células CHO, obteniendo niveles de expresión menores a los reportados para las células HEK293 [106].

11.1. Análisis de los N-glicanos de la enzima α -Galactosidasa A recombinante

La forma secretada de la enzima producida en células de mamíferos se caracteriza por presentar oligosacáridos de alta manosa (63%), complejos (30%) e híbridos (5%). Los oligosacáridos de alta manosa predominantes son del tipo $\text{Man}_{5-7}\text{GlcNAc}_2$. Aproximadamente, alrededor de 40% de los oligosacáridos de alta manosa y un 30% de los oligosacáridos híbridos se hallan unidos a un grupo monoéster fosfato. Los oligosacáridos de tipo complejo son mono-, bi-, 2,4-tri, 2,6-tri y tetraantenarios, con o sin un core de fucosa. Alrededor de un 30% de los N-glicanos complejos son mono- o bi-sialilados. El ácido siálico mayoritario se presenta como ácido Neu5Ac α -2,3-unido. Por el contrario, la enzima intracelular presenta solo pequeñas proporciones de glicanos complejos (7,7%) y un elevado porcentaje de oligosacáridos de alta manosa (92%), principalmente como $\text{Man}_{5-7}\text{GlcNAc}_2$, de los cuales sólo un 3% se haya fosforilada [107].

OBJETIVOS

OBJETIVOS DEL TRABAJO

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del proyecto es el desarrollo de una tecnología de producción de la enzima alfa Galactosidasa humana recombinante (rhαGAL) para uso terapéutico.

En este proyecto, se propone el uso de vectores lentivirales de tercera generación para la construcción de líneas y clones celulares productores de la enzima rhαGAL. Estos vectores tienen la capacidad de integrarse al genoma de la célula productora en múltiples sitios transcripcionalmente activos, logrando de esta manera líneas celulares recombinantes con elevados niveles de producción.

Por otra parte, se prevé el desarrollo y optimización del protocolo de purificación que permita obtener la enzima pura y activa a partir de sobrenadantes de cultivos. Por ello, es de particular interés el desarrollo de líneas y clones celulares adaptadas a crecer en suspensión en medios libres de SFB. De esta forma se acorta el tiempo de generación de los clones productores, ya que se prescinde de los procedimientos de adaptación al crecimiento en suspensión, necesarios para la producción a gran escala en biorreactores. Además, se evita desde el inicio el uso de un suplemento muy controvertido desde el punto de vista regulatorio, como es el suero fetal bovino.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar métodos de control de calidad de la rhαGAL necesarios para el proceso de producción de la enzima y el producto final.
2. Producir la enzima rhαGAL mediante el cultivo de líneas y clones celulares CHO-K1, con características apropiadas en cuanto a productividad y crecimiento, en un biorreactor en modo continuo (perfusión) a escala piloto.
3. Desarrollar una metodología de purificación de rhαGAL a partir de sobrenadantes de cultivo.
4. Caracterizar las propiedades fisicoquímicas, bioquímicas y la actividad biológica de rhαGAL purificada.

RESULTADOS

RESULTADOS PARTE 1

“Desarrollo de métodos de control de calidad de la rhuGAL necesarios para el seguimiento del proceso de producción y del producto final”

Los biofármacos están sujetos a rigurosos requisitos, que además de contemplar aspectos regulatorios, se reducen a dos necesidades centrales: pureza e integridad. La caracterización del terapéutico normalmente se realiza durante el desarrollo del proceso de producción de manera de determinar las características fisicoquímicas e inmunoquímicas, actividad biológica, y la calidad final del producto. Se deben desarrollar técnicas analíticas que exploren diferentes propiedades fisicoquímicas de la molécula (tamaño, carga, pl, secuencia de aminoácidos, hidrofobicidad). Las modificaciones postraduccionales, en particular el perfil de glicosilación, deben ser identificadas y caracterizadas.

Además de evaluar la pureza es necesario identificar el grado de impurezas, es decir, aquellos componentes derivados del proceso (por ejemplo, componentes del medio de cultivo, ligandos desprendidos a partir de las matrices cromatográficas, conocidos como *leacheables*, en inglés), derivados del huésped (proteínas derivadas del huésped, endotoxinas, virus, ácidos nucleicos y otras biomoléculas) o proteínas indeseables provenientes del mismo producto (por ejemplo, agregados como dímeros o multímeros, que suelen llamarse impurezas relacionadas al producto). La ausencia de dichas moléculas debe ser asegurada por diferentes técnicas analíticas tales como ELISA, western blot y LAL test (test de endotoxinas, *Limulus Amebocyte lysate*).

El término integridad hace referencia a las características inherentes del propio biofármaco. Se debe demostrar su identidad mediante diferentes técnicas como espectroscopía de masa, *western blot* y ensayos de inmunogenicidad. También se deberá asegurar una correcta conformación espacial de manera de garantizar una elevada actividad específica y que la misma no se haya alterado durante todo el proceso de producción; esto es posible mediante técnicas analíticas tales como espectroscopía de fluorescencia, cromatografía de exclusión molecular (SEC, *size exclusion chromatography*), DLS (*dynamic light scattering*) o cristalografía de rayos X [108].

Algunas pruebas se deben realizar inicialmente y/o periódicamente para establecer o verificar la validez y aceptabilidad de un producto y de su proceso de fabricación. Se espera un análisis exhaustivo de los lotes de producción iniciales para establecer consistencia con respecto a la identidad, pureza y potencia. Una serie más limitada de pruebas será apropiada para el control de rutina de manera de garantizar la calidad del producto [109].

Para el desarrollo del proceso de producción de la enzima $\text{rh}\alpha\text{GAL}$ es necesario entonces realizar un seguimiento tanto de la concentración como de la calidad de la enzima, para lo cual se desarrollaron ensayos de cuantificación e identificación, empleando como molécula de referencia un lote del producto comercial Fabrazyme®, *agalsidase beta*, Genzyme (E 2033 H 14).

1. Plan de Inmunización

Para poner a punto los ensayos de cuantificación e identificación, en primer lugar, se llevó a cabo la obtención de los anticuerpos policlonales (pAb) anti- $\text{rh}\alpha\text{GAL}$ mediante un plan de inmunización en conejos con repetidas dosis de 50 μg del producto comercial Fabrazyme®. Se utilizó la metodología de inoculación multisitio, inyectando aproximadamente 1 ml de la mezcla en 10 sitios diferentes de dicha región. De esta manera, se realizó una primera inmunización preparando una emulsión con adyuvante completo de Freund, seguido de dos inmunizaciones adicionales empleando adyuvante incompleto de Freund. A los 7 y 14 días posteriores de la última inmunización se realizó la extracción del suero. La sangría de los animales se realizó por la vena marginal de la oreja obteniendo muestras de sangre entre 5 y 10 ml. Finalmente, se realizó un ELISA específico indirecto para evaluar el título de anticuerpos de cada extracción y del *pool* de sueros. El título de anticuerpos se define como aquel valor de dilución que se encuentra por encima del valor de corte (*cut-off*), definido como el promedio del blanco (sin suero) más tres desviaciones estándar. Se obtuvo un título de 1/512.000 y 1/370.000, para cada una de las extracciones (Figura 11) y de 1/455.000 para el *pool* de anticuerpos (Figura 12).

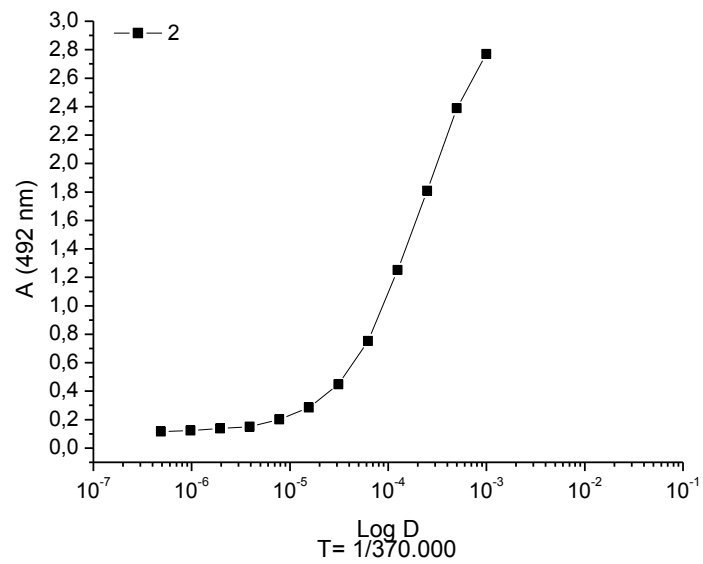
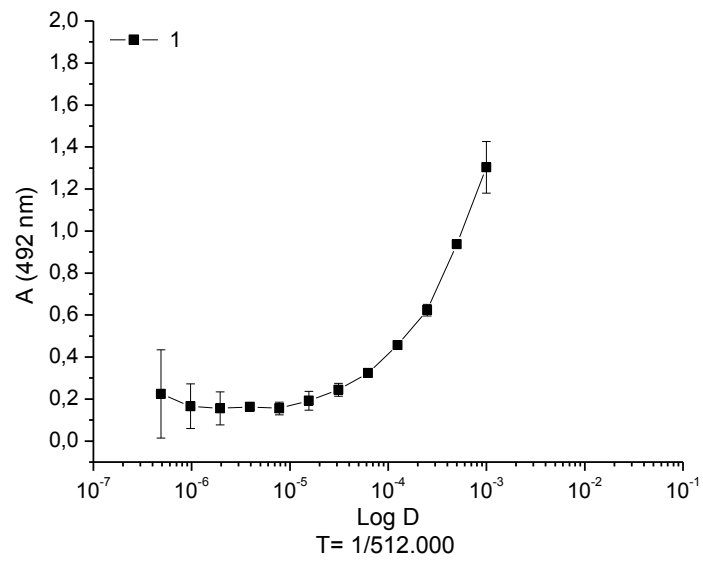


Figura 11. Titración del pAb anti-rhGAL (primera y segunda extracción), mediante ELISA específico indirecto. Se representó la respuesta del ensayo, medida como la absorbancia a $\lambda = 492$ nm, en función del logaritmo de la dilución.

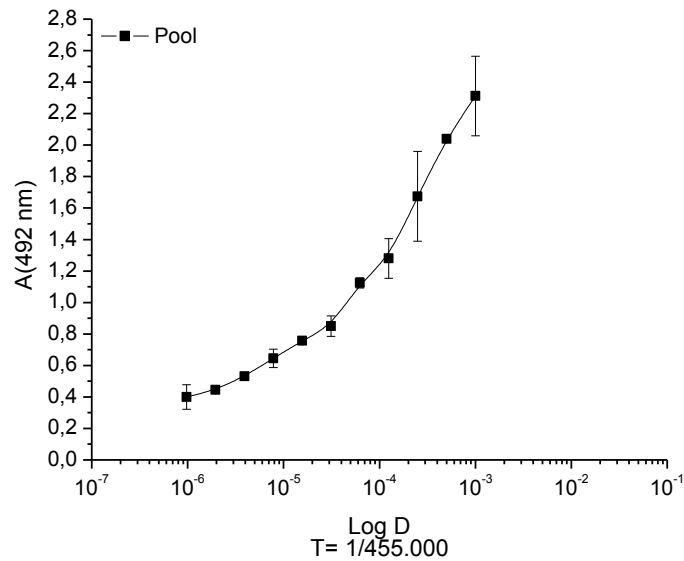


Figura 12. Titulación del pAb anti-rhαGAL (pool de dos extracciones), mediante ELISA específico indirecto. Se representó la respuesta del ensayo, medida como la absorbancia a $\lambda=492$ nm, en función del logaritmo de la dilución.

2. Ensayos de cuantificación

2.1. Enzimoinmunoensayo (ELISA)

2.1.1. Purificación de pAb anti-rhαGAL mediante cromatografía de afinidad a proteína A

Con el fin de obtener cantidades suficientes del pAb anti-rhαGAL, el mismo se purificó a partir del suero de conejo mediante cromatografía de afinidad a proteína A (MabSelect SuRe, GE Healthcare). La Figura 13 muestra el cromatograma obtenido durante la purificación del anticuerpo, la cual fue monitoreada por espectrofotometría a $\lambda=280$ nm.

Finalizado el procedimiento, se mezclaron las fracciones correspondientes al pico de elución y se evaluó la pureza mediante SDS-PAGE seguido de tinción por azul brillante de *Coomassie*.

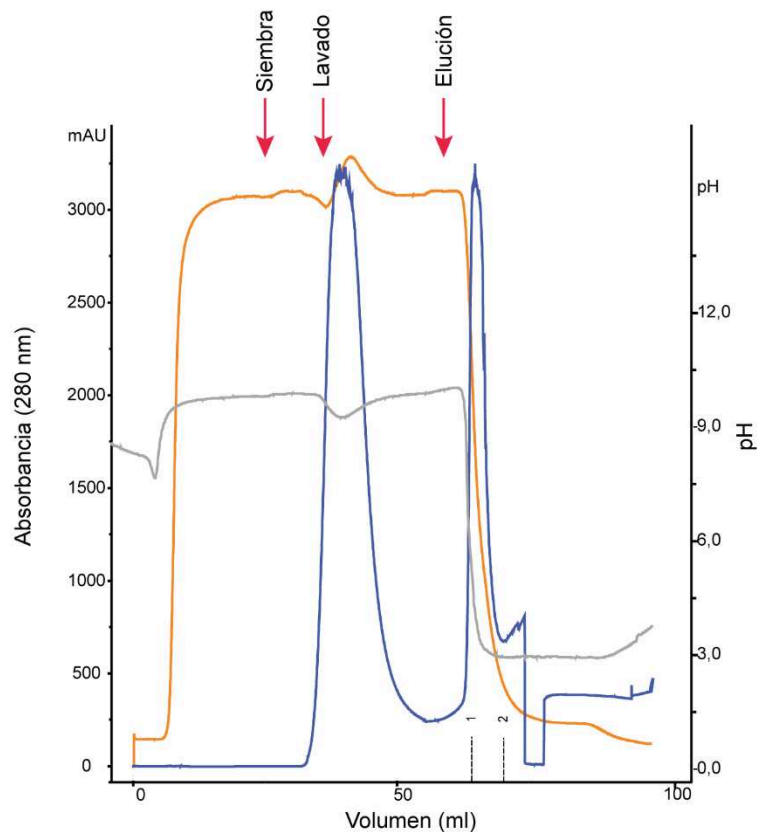


Figura 13. Purificación del pAb anti-rh α GAL por cromatografía de afinidad a proteína A. En el cromatograma se representan las señales de absorbancia a $\lambda = 280$ nm (azul), conductividad (naranja) y pH (gris), en función del volumen de elución. Se indican, además, las etapas de siembra, lavado y elución. Los números indican las fracciones recolectadas para su posterior análisis.

2.1.1.1. Evaluación del proceso de purificación pAb anti-rh α GAL

Para evaluar la purificación del pAb anti-rh α GAL por cromatografía de afinidad se realizó un SDS-PAGE seguido de una tinción por azul brillante *Coomassie* (Figura 14).

En la elución del anticuerpo (carriles 4 y 5) se visualizaron dos bandas mayoritarias correspondientes a las cadenas pesada (50 kDa) y liviana (25 kDa) de las Inmunoglobulinas (Igs). Simultáneamente, se detectó albúmina sérica bovina (ASB) como el contaminante de mayor proporción. El grado de pureza obtenido (96%, aproximadamente) se consideró adecuado para la utilización de dichos anticuerpos en los ensayos de cuantificación.

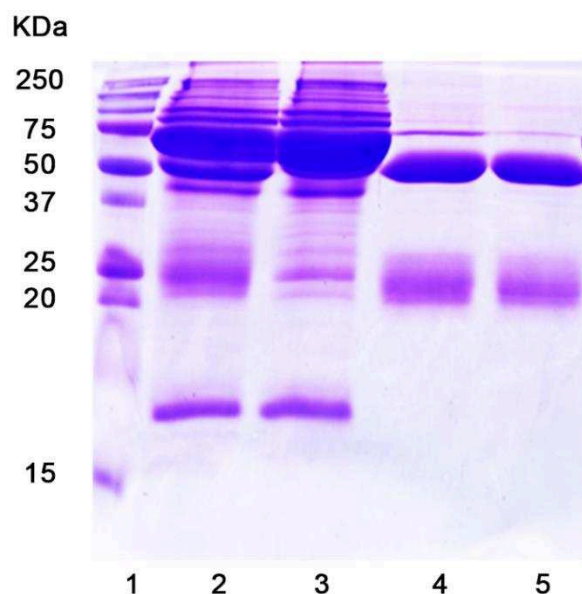


Figura 14. Evaluación de la pureza del pAb anti-rhαGAL por cromatografía de afinidad a proteína A. Las fracciones correspondientes a cada etapa de purificación se analizaron mediante SDS-PAGE seguido de tinción por azul brillante *Coomassie*. Calles: 1- Marcadores de masa molecular (Bio-Rad); 2- Siembra; 3- *Flowthrough* (FT); 4- Elución fracción 1; 5- Elución fracción 2.

2.1.2. Conjugación del pAb anti-rhαGAL a biotina

Para continuar con el desarrollo del ensayo de ELISA para la cuantificación de la enzima rhαGAL, una fracción del pAb purificado se dializó contra solución tampón cítrico/citrato 0,1M pH 8,8 y se conjugó a biotina. Para medir la eficiencia de conjugación se realizó un ELISA específico indirecto. El título del pAb conjugado se determinó como la dilución correspondiente a dos veces la absorbancia del blanco. Se obtuvo un título de 1/16.000 para el pAb anti-rhαGAL biotinilado (a-rhαGAL biot) (Figura 15).

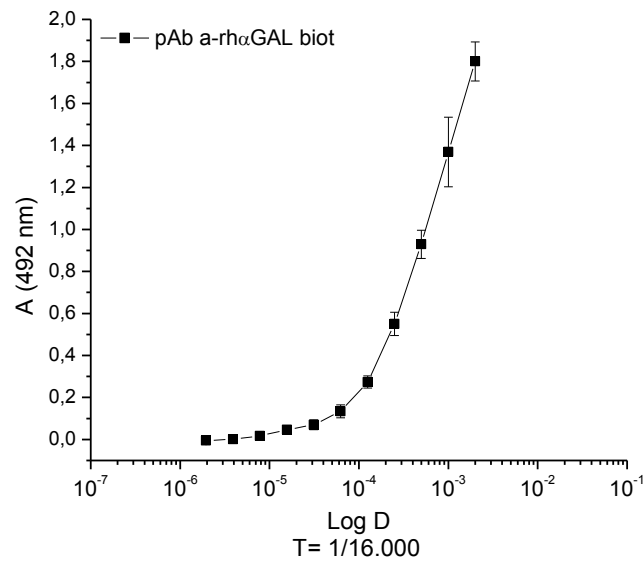


Figura 15. Titulación del pAb anti-rhαGAL biotilado mediante ELISA específico indirecto. Se representó la respuesta del ensayo, medida como la absorbancia a $\lambda = 492$ nm, en función del logaritmo de la dilución.

2.1.3. Desarrollo de un ensayo de ELISA sándwich

Se desarrolló un ensayo de ELISA sándwich consistente en la captura de la rhαGAL por pAbs de conejo inmovilizados en fase sólida. Posteriormente, se llevó a cabo la detección con pAbs de conejo conjugados con biotina, cuya presencia se reveló por incubación con estreptavidina conjugada con la enzima peroxidasa, que cataliza la transformación de un sustrato incoloro en una sustancia coloreada. Se probaron dos diluciones del pAb a-rhαGAL biot: 1/400 y 1/800 (Figura 16).

Se calcularon las siguientes cifras de mérito del método desarrollado (Tabla 1): sensibilidad (SEN), sensibilidad analítica (SEN_γ), límite de detección (LOD, *limit of detection*), límite de cuantificación (LOQ, *limit of quantification*) y rango lineal. La SEN de calibración es igual a la pendiente de la recta de calibrado, mientras que la SEN_γ, se define como la relación entre la sensibilidad y el ruido instrumental (estimado a partir del desvío estándar de los residuos de la regresión lineal, S_{fit}). El LOD se calculó como 3,3 veces el desvío estándar de la concentración predicha para una muestra blanco (S₀) mientras que el límite de cuantificación como diez veces el S₀.

Para estimar el valor de S_0 , se procedió de la siguiente manera:

$$S_{x_{inc}} = \frac{S_{fit}}{A} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(x_{inc} - \bar{x})^2}{\sum(x_i - \bar{x})^2}} \quad (1)$$

Si suponemos que se analiza una muestra por triplicado (lo más usual es $m = 3$) en la que el analito no está presente ($x_{inc} = 0$), la ecuación (1) se reduce a:

$$S_0 = \frac{S_{fit}}{A} \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum(x_i - \bar{x})^2}} \quad (2)$$

Donde A es la pendiente de la recta de calibrado, n es el número total de puntos y m el número de réplicas por punto; x_i es el valor de cada nivel de la variable independiente y \bar{x} es el promedio de las concentraciones de calibrado.

Se considera que el rango lineal comprende desde la menor concentración que puede medirse (el LOQ) hasta la pérdida de la linealidad. El estudio de la linealidad se realizó a partir de la prueba F (p asociado $>,01$) [110].

Para el cálculo de las cifras de méritos de las distintas técnicas analíticas desarrolladas a lo largo de esta sección, se emplearán las mismas ecuaciones.

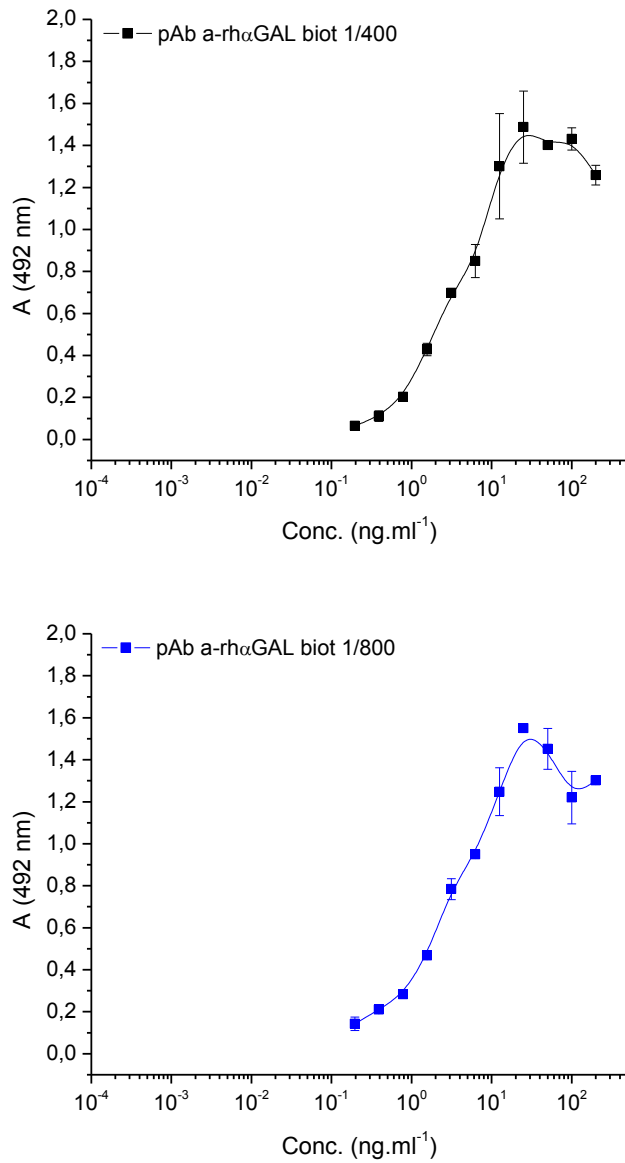


Figura 16. ELISA sándwich para la cuantificación de rhαGAL. Se representó la respuesta del ensayo, medida como la absorbancia a $\lambda = 492$ nm, en función la concentración de la enzima. Las curvas se realizaron utilizando producto comercial Fabrazyme®, desde una concentración inicial de 200 ng.ml⁻¹.
 (■) Dilución 1/400 del pAb a-rhαGAL biot. (■) Dilución 1/800 del pAb a-rhαGAL biot.

Tabla 1. Cifras de mérito del ensayo de ELISA sándwich.

| | SEN (ml.ng ⁻¹) | SEN _γ (ml.ng ⁻¹) | LOD (ng.ml ⁻¹) | LOQ (ng.ml ⁻¹) | Rango Lineal (ng.ml ⁻¹) | P (Prueba F) |
|--------------|-------------------------------|--|-------------------------------|-------------------------------|---|--------------------|
| 1/400 | 0,8 | 7,5 | 0,34 | 1,0 | 1,0-25 | ,49 |
| 1/800 | 0,8 | 14,8 | 0,17 | 0,5 | 0,5-50 | ,31 |

Luego de evaluar las cifras de mérito del ensayo y considerar el menor gasto de reactivos, se decidió emplear la dilución 1/800 del pAb a-rhαGAL biot.

2.1.4. Evaluación de diferentes entornos proteicos (efecto matriz)

Un problema común que se presenta en los inmunoensayos es la influencia que ejercen los componentes de la solución en donde se encuentra la molécula a cuantificar sobre el reconocimiento inmunológico, fenómeno que se conoce como efecto matriz. Cuanto mayor sea el grado de complejidad de la matriz, como es el caso de los fluidos biológicos como suero, orina, etc., mayor es la probabilidad de que exista un efecto de esta índole. El mismo puede ser causado por interacciones de naturaleza inespecífica entre los componentes del medio (proteínas, lípidos y compuestos químicos, entre otros) y el analito. Este efecto puede conducir a una cuantificación incorrecta de la enzima si ésta se encuentra en un medio de dilución diferente al del estándar. Con el fin de evaluar dicho efecto sobre la determinación de la concentración de la enzima rhαGAL en diferentes entornos, se llevó a cabo un ELISA sándwich, realizando la dilución final del producto comercial Fabrazyme® en diferentes medios diluyentes. Éstos se seleccionaron teniendo en cuenta los posibles entornos en los que se podría encontrar la enzima durante el desarrollo del proceso, utilizando además medios de dilución frecuentemente empleados para este tipo de técnicas.

Para analizar la influencia de los diferentes medios de dilución, se calculó el porcentaje de recuperación de la concentración de la enzima en cada uno de ellos, utilizando como estándar la curva del producto comercial Fabrazyme® diluida en solución de ASB 0,1% (p/v) en PBS–Tween 20 0,05% (v/v). La concentración de la enzima se determinó interpolando en las distintas curvas con un valor de absorbancia constante correspondiente al 50% de la zona de linealidad de la curva estándar (donde la leva (o *leverage*) es mínima, es decir, donde la señal del analito es próxima al promedio de las señales de la curva de calibrado). El cociente entre la concentración de rhαGAL estándar y la dilución correspondiente a cada preparación para la mencionada absorbancia permitió determinar la concentración de la proteína. Posteriormente, se calculó la recuperación según la ecuación 3, donde CD es la concentración de rhαGAL obtenida luego de la interpolación en las curvas correspondientes a los diferentes diluyentes y CR, la concentración de rhαGAL real agregada a cada medio.

$$R(\%) = \frac{CD}{CR} * 100 \quad (3)$$

En la Figura 17 se observa que no se encontraron diferencias en la recuperación en los diferentes medios diluyentes (Tabla 2). El promedio de las recuperaciones en el punto medio de la curva del estándar para todos los medios de dilución empleados fue del $88,8 \pm 12,8$ % (promedio \pm DS). Teniendo en cuenta el coeficiente de variación intra-ensayo calculado para este esquema de ELISA (como se describe más abajo), este resultado indicaría que la interacción de la enzima con los anticuerpos empleados en el ensayo no se encuentra afectada por las características de la matriz.

Tabla 2. Porcentaje de recuperación del ensayo de ELISA sándwich en diferentes entornos. Concentración nominal estándar* 12,5 ng.ml⁻¹.

| | Conc. predicha (ng.ml⁻¹) | R (%) |
|--|--|------------------|
| Medio CHO-K1s condicionado | 12,5 | 100,0 |
| EX-CELL® 302 | 12,5 | 100,0 |
| ASB 5% / PBS–Tween 20 0,05% (v/v) | 12,5 | 100,0 |
| Medio CHO-K1adh condicionado | 10,1 | 81,0 |
| DMEM/HAM´S-F12 95% / SFB 5% (v/v) | 8,9 | 70,9 |
| SFB 5% / PBS–Tween 20 0,05% (v/v) | 10,1 | 81,0 |

*Producto comercial Fabrazyme® diluido en solución de ASB 0,1% (p/v) en PBS-Tween 20 0,05% (v/v).

Otro parámetro fundamental a considerar en este tipo de ensayos es el paralelismo de las curvas dosis-respuesta. Idealmente, las curvas del estándar y analito deberían ser paralelas. El análisis de este factor tiene implicancias funcionales, ya que permite distinguir diferencias en la capacidad de reconocimiento del estándar y el analito por parte del anticuerpo, e implicancias prácticas, ya que permite determinar la concentración del analito en una muestra mediante la interpolación en cualquier sector de la zona lineal de la curva del estándar. Como se observa en la Figura 17, los diferentes medios de dilución no afectaron el paralelismo ni el valor de saturación.

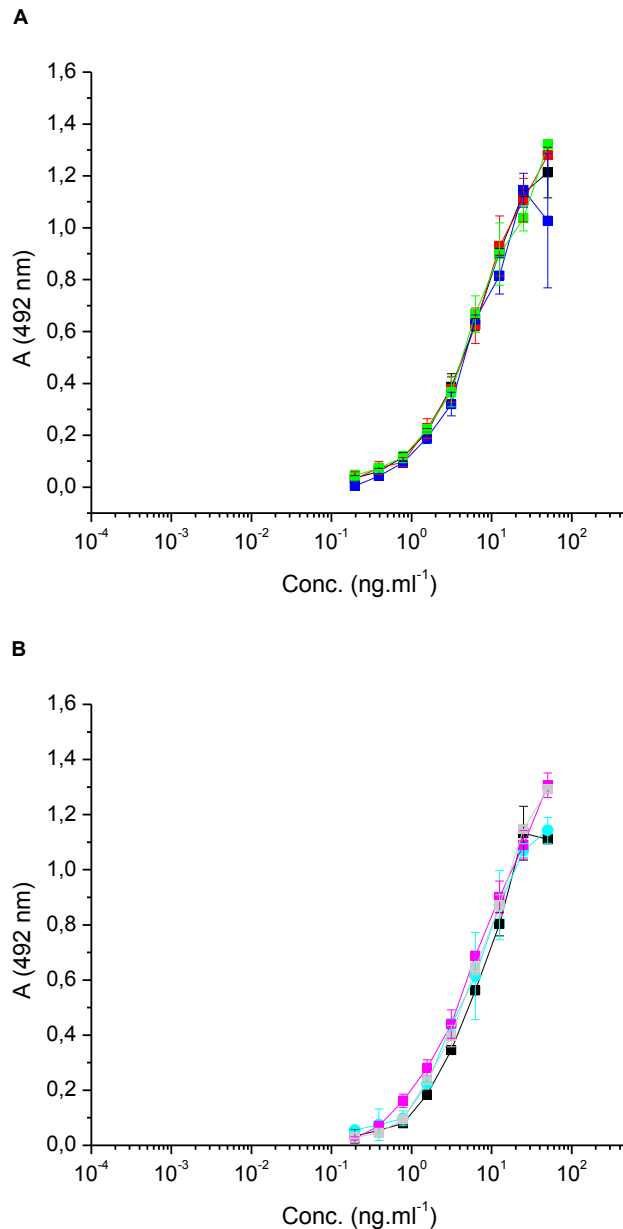


Figura 17. Evaluación de la influencia del medio de dilución en la cuantificación de la rhGAL mediante técnica de ELISA sándwich. Las curvas se realizaron utilizando el producto comercial Fabrazyme® desde una concentración inicial de 50 ng.ml⁻¹. ASB 0,1% (P/V) en PBS-Tween 20 0,05% (v/v) (■), ASB 5% (P/V) en PBS-Tween 20 0,05% (V/V) (■), medio de cultivo EX-CELL® 302 (■); medio de cultivo EX-CELL® 302 condicionado por el crecimiento de células CHO-K1 suspensión (■) (A). ASB 0,1% (P/V) en PBS-Tween 20 0,05% (v/v) (■), SFB 5% (v/v) en PBS-Tween 20 0,05% (v/v) (■); medio de cultivo DMEM/Ham's-F12 95% / 5% SFB (v/v) (■); medio de cultivo DMEM/Ham's-F12 95% / 5% SFB (v/v) condicionado por el crecimiento de células CHO-K1 adherentes (■) (B).

A su vez, al realizar la suma de cuadrados condicional es posible realizar una comparación de las diferentes líneas de regresión y evaluar así, la significancia estadística de los términos del modelo. Dado que el valor p calculado para las diferentes pendientes es mayor a 0,1 ($p = ,9705$), no existen diferencias estadísticas

entre las pendientes, con un nivel de confianza mayor o igual al 90%. De igual manera, dado que el valor p calculado para las diferentes ordenadas al origen es mayor a 0,1 ($p = ,9014$), no existe diferencia significativa entre las mismas, con un nivel de confianza mayor o igual al 90%.

2.1.5. Evaluación de la reproducibilidad intra- e inter-ensayo

La determinación de la concentración fue realizada utilizando el ensayo de rectas paralelas, basado en la comparación de la respuesta de una muestra con la de un estándar de referencia. Todas las curvas se realizaron por triplicado, utilizándose como estándar el producto comercial Fabrazyme® desde una concentración inicial de 50 ng.ml^{-1} .

La puesta a punto de un ensayo de cuantificación requiere necesariamente de la estimación de la precisión o reproducibilidad del ensayo. La evaluación de estos parámetros estadísticos demanda el análisis de mediciones reiteradas de diferentes muestras del analito, dentro del mismo ensayo o en ensayos reproducidos en diferentes ocasiones, para luego calcular los coeficientes de variación (CV) intra-ensayo o inter-ensayo, respectivamente. Con este fin, se determinó la concentración de dos muestras conteniendo rhGAL presentes en sobrenadantes de cultivo mediante técnica de ELISA sándwich. Las muestras se procesaron por triplicado dentro de cada ensayo, reiterándose en tres ocasiones diferentes. El CV intra e inter-ensayo se calculó utilizando la ecuación 4,

$$CV = \frac{SD}{P} \quad (4)$$

donde CV representa el coeficiente de variación, SD, la desviación estándar resultante de la determinación de la concentración de la rhGAL por triplicado y P el promedio de las mencionadas determinaciones. En el caso de determinar el CV intra-ensayo, SD y P representaron la desviación estándar y el promedio de la cuantificación realizada por triplicado dentro del mismo ensayo. Cuando se evaluó el CV inter-ensayo, SD y P representaron la desviación estándar y el promedio de las concentraciones calculadas a partir de las determinaciones realizadas en tres ocasiones diferentes.

En la tabla 3 se resumen los CV intra e inter-ensayo empleando el procedimiento de ELISA sándwich. Los valores de los CV intra-ensayo oscilaron entre un 4 y 18%, con un CV promedio de $10 \pm 5 \%$ (promedio de los coeficientes \pm SD), respectivamente. Las determinaciones inter-ensayo demostraron un CV promedio de $20 \pm 2 \%$ (promedio de los coeficientes \pm SD). Estos valores de CV son comparables a los publicados para otros ensayos de ELISA utilizados para la cuantificación de diferentes biomoléculas.

Tabla 3. Reproducibilidad intra- e inter-ensayo del procedimiento de ELISA sándwich para la cuantificación de la r α GAL.

| Reproducibilidad | | | | |
|------------------|---------------------|---|----|---------------------|
| Muestra | CV Intra-ensayo (%) | | | CV Inter-ensayo (%) |
| 1 | 7 | 9 | 18 | 21 |
| 2 | 8 | 4 | 12 | 19 |

2.2. Actividad enzimática *in vitro*

La actividad enzimática *in vitro* de la r α GAL se determinó mediante hidrólisis del sustrato artificial 4-metilumbeliferil- α -D-galactopiranosido no fluorescente (4MU- α -Gal, Sigma-Aldrich, USA). La reacción se llevó a cabo en solución tampón citrato de sodio pH 4,7 a 37°C durante 30 min en un volumen final de 0,06 ml y se detuvo mediante el agregado de 0,24 ml de solución tampón glicina 0,15 M pH 10,4. El producto fluorescente liberado (4-metilumbeliferona, 4-MU) se determinó por lectura de la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 355 nm y una longitud de onda de emisión de 450 nm.

Se realizó una curva de calibrado de 4-MU estándar (Figura 18) y se calcularon las cifras de mérito del método (Tabla 4). De igual manera, se realizó una curva de calibrado de la molécula de referencia Fabrazyme® (Figura 19). Esta última permitió principalmente estudiar la respuesta analítica y determinar el rango lineal de trabajo. Para un tiempo final de 30 min, el ensayo presentó un rango lineal entre 32,5 y 100 ppb (valor p asociado a prueba F ,11) y un límite de detección de 10,7 ppb.

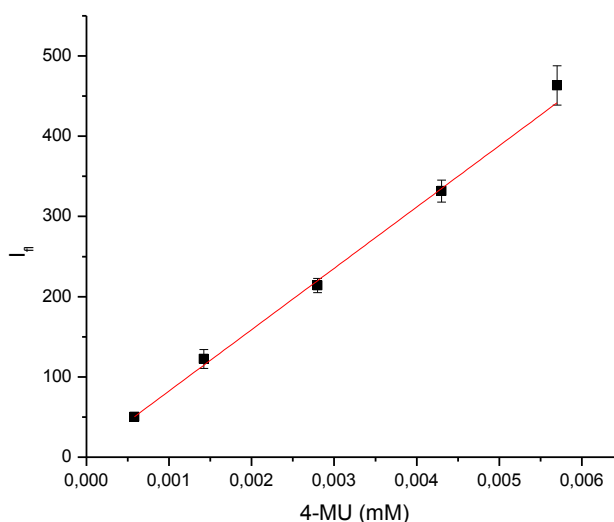


Figura 18. Curva de Calibrado de 4-MU. Se representó la respuesta del ensayo, medida como intensidad de fluorescencia (longitud de onda de excitación de 355 nm y longitud de onda de emisión de 450 nm), en función la concentración de 4-MU (mM).

Tabla 4. Cifras de mérito de la curva de calibrado de 4-MU.

| SEN (mM ⁻¹) | SEN _γ (mM ⁻¹) | LOD (mM) | LOQ (mM) | Rango Lineal (mM) | P (Prueba F) |
|----------------------------|---|------------------------|------------------------|---|-----------------|
| 7,9 x 10 ⁴ | 5,0 x 10 ³ | 6,0 x 10 ⁻⁴ | 1,9 x 10 ⁻³ | 1,9 x 10 ⁻³ 6x 10 ⁻³ | ,20 |

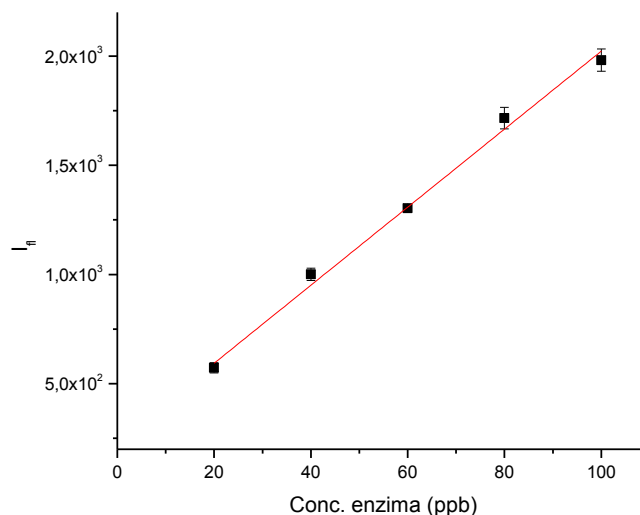


Figura 19. Curva de calibrado de la molécula de referencia, Fabrazyme® (30 min, 37°C). Se representó la respuesta del ensayo, medida como intensidad de fluorescencia (longitud de onda de excitación de 355 nm y longitud de onda de emisión de 450 nm), en función la concentración de enzima (ppb).

2.2.1. Evaluación de diferentes entornos proteicos (efecto matriz)

Con el fin de evaluar el efecto matriz sobre la determinación de la actividad enzimática *in vitro* de rhaGAL, la dilución final de la molécula de referencia, Fabrazyme®, se realizó en el medio diluyente a evaluar. Como se mencionó con anterioridad, los medios diluyentes se seleccionaron teniendo en cuenta los posibles entornos en los que se podría encontrar la enzima durante el desarrollo del proceso, utilizando además medios de dilución frecuentemente empleados para este tipo de técnicas. Para analizar la influencia de los diferentes medios de dilución, se calculó el porcentaje de recuperación de la actividad de la enzima en cada uno de ellos, utilizando como estándar la molécula de referencia diluida en solución tampón citrato de sodio 0,1 M pH 4,7. El cociente entre la actividad enzimática (UI.ml⁻¹) estándar y la dilución correspondiente en cada preparación permitió determinar la recuperación según la ecuación 3.

No se encontraron diferencias en la recuperación en los diferentes medios, a excepción del medio EX-CELL® 302 condicionado por células CHO-K1 wt (*wild type*) en suspensión (Tabla 5). El promedio de las recuperaciones en el punto medio de la

curva del estándar para aquellos medios donde no se observó efecto matriz fue del $96,4 \pm 6,4$ % (promedio \pm SD).

Tabla 5. Porcentaje de recuperación en el ensayo de actividad enzimática *in vitro*. Actividad nominal estándar* $39,5 \text{ UI.ml}^{-1}$.

| | Actividad predicha (UI.ml^{-1}) | R (%) |
|---|---|----------|
| Medio CHO-K1s condicionado | 197,2 | 499,0 |
| EX-CELL® 302 | 53,5 | 135,0 |
| ASB 5% / PBS–Tween 20 0,05% (v/v) | 42,2 | 106,0 |
| Medio CHO-K1adh condicionado | 41,8 | 106,0 |
| DMEM/HAM' s-F12 95% / SFB 5% (v/v) | 38,2 | 97,0 |
| SFB 5% / PBS–Tween 20 0,05% (v/v) | 36,3 | 92,0 |

*Producto comercial Fabrazyme® diluido en solución tampón citrato de sodio pH 4,7.

Una forma de soslayar el efecto matriz es utilizar la técnica de adición estándar, que consiste en la adición de cantidades conocidas y crecientes del analito de interés a la muestra problema, la lectura de la respuesta instrumental (intensidad de fluorescencia) y la posterior construcción de la curva de calibrado al punto del eje de abscisas donde la respuesta es cero.

Con el fin de discernir el origen del efecto matriz, se realizaron dos curvas de adición estándar. Para ello, en la primera curva, se tomó una muestra de sobrenadante condicionado por el crecimiento de células CHO-K1 suspensión (CHO-K1s) wt (muestra problema 1) y se prepararon seis estándares por adición sucesiva de diversas cantidades de 4-MU en volumen final de 0,15 ml; mientras que en la segunda curva se reemplazó la muestra problema por sobrenadante condicionado por el crecimiento de un clon de células CHO-K1 productor de la enzima rhGAL (muestra problema 2).

Al realizar la comparación estadística de las dos rectas de regresión (Figura 20), el valor p calculado, tanto para la ordenada al origen como para la pendiente (,3367 y ,7461, respectivamente), fue mayor a ,1 lo que indica que no existen diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza mayor o igual al 90%. A partir de esto, se puede concluir que el efecto matriz no lo originaría la interacción de la enzima con el producto formado (4-MU), sino otro componente del medio de cultivo condicionado.

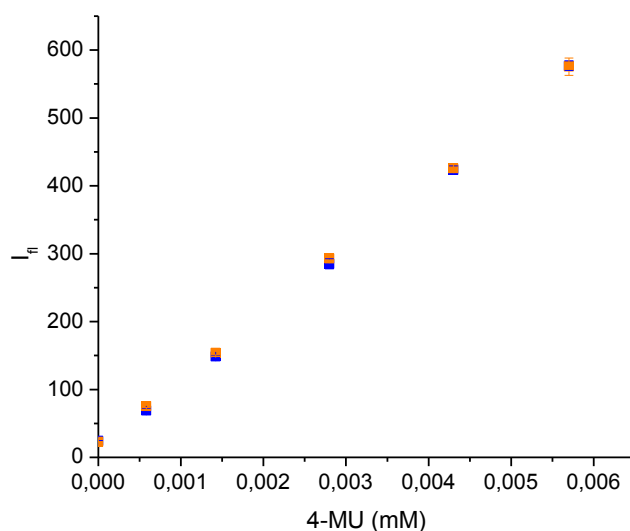


Figura 20. Comparación de curvas de adición estándar 4-MU. Se representó la respuesta del ensayo, medida como intensidad de fluorescencia (longitud de onda de excitación de 355 nm y longitud de onda de emisión de 450 nm), en función la concentración de 4-MU (mM). El ensayo se llevó a cabo utilizando como matriz medio de cultivo EX-CELL® 302 condicionado por el crecimiento de células CHO-K1s *wt* (■) y medio de cultivo EX-CELL® 302 condicionado por el crecimiento de un clon productor CHO-K1s (■).

Sobre la base de lo anterior, para la construcción de la curva de adición estándar 4-MU se empleó la muestra problema 1.

Posteriormente, al realizar la comparación estadística de la curva de calibrado 4-MU y la curva de adición estándar 4-MU, el valor p calculado, tanto para la ordenada al origen como de la pendiente, fue menor a ,01, por lo que se determinó la existencia de diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 99%. Esto último permitió confirmar la existencia de un efecto matriz originado por un componente del medio de cultivo condicionado por células CHO-K1s *wt*.

A continuación se muestra la curva de patrones puros y la curva de adición estándar 4-MU (Figura 21). En la Tabla 6 se muestran las cifras de mérito de la curva de adición estándar.

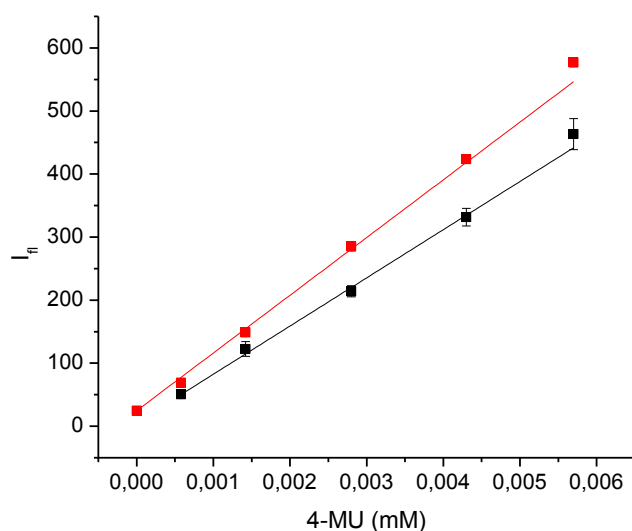


Figura 21. Curva de patrones puros (■) y curva de adición estándar (■) 4-MU. Se representó la respuesta del ensayo, medida como intensidad de fluorescencia (longitud de onda de excitación de 355 nm y longitud de onda de emisión de 450 nm), en función la concentración de 4-MU (mM).

Tabla 6. Cifras de mérito de la curva de calibrado de 4-MU adición estándar.

| SEN (mM ⁻¹) | SEN _y (mM ⁻¹) | LOD (mM) | LOQ (mM) | Rango Lineal (mM) | P (Prueba F) |
|----------------------------|---|------------------------|------------------------|--|-----------------|
| 9,4 x 10 ⁴ | 1,7 x 10 ⁴ | 2,2 x 10 ⁻⁴ | 6,7 x 10 ⁻⁴ | 6,7 x 10 ⁻⁴ 4,3 x 10 ⁻³ | ,18 |

2.2.2. Evaluación de la reproducibilidad intra- e inter-ensayo

Con el fin de determinar los CV inter e intra-ensayo, se determinó la actividad enzimática de dos muestras conteniendo rhoGAL presentes en sobrenadantes de cultivo mediante la técnica de actividad enzimática *in vitro*. Las muestras se procesaron por triplicado dentro de cada ensayo, reiterándose en tres ocasiones diferentes. El CV intra e inter-ensayo se calculó utilizando la ecuación 4.

En la Tabla 7 se resumen los CV intra e inter-ensayo. Los valores de los CV intra-ensayo oscilaron entre un 3 y 7 %, con un CV promedio de 5 ± 2 %, respectivamente. Las determinaciones inter-ensayo demostraron un CV promedio de 18 ± 4 %.

Tabla 7. Reproducibilidad intra- e inter-ensayo del ensayo de actividad enzimática *in vitro*.

| Reproducibilidad | | | | |
|------------------|---------------------|---|---|---------------------|
| Muestra | Intra-ensayo CV (%) | | | Inter-ensayo CV (%) |
| 1 | 3 | 7 | 4 | 15 |
| 2 | 7 | 4 | 7 | 21 |

2.2.3. Determinación de los parámetros cinéticos

Para la determinación de los parámetros cinéticos (K_m , K_{cat} y K_{cat}/K_m), se incubó la enzima de referencia Fabrazyme® con concentraciones variables de sustrato, en las condiciones de reacción detalladas en el apartado 8.2.3 de *Materiales y Métodos*. Se partió del supuesto que la enzima sigue una cinética hiperbólica de Michaelis-Menten (Figura 22), y se aplicó la ecuación de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk. De igual manera, se aplicó la ecuación de Eadie Hofstee para el cálculo de los parámetros cinéticos (Tabla 8). Las Figuras 23 y 24, respectivamente, muestran las gráficas de dobles recíprocos y de Eadie Hofstee para la molécula de referencia.

Tabla 8. Parámetros cinéticos de la molécula de referencia.

| | K_m (mM) | K_{cat} (min^{-1}) | K_{cat}/k_m ($\text{min}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$) |
|------------------------|---------------|------------------------------------|---|
| Lineweaver-Burk | $1,5 \pm 0,6$ | 1200 ± 300 | 800 ± 300 |
| Eadie Hofstee | $1,4 \pm 0,2$ | 1200 ± 200 | 800 ± 200 |

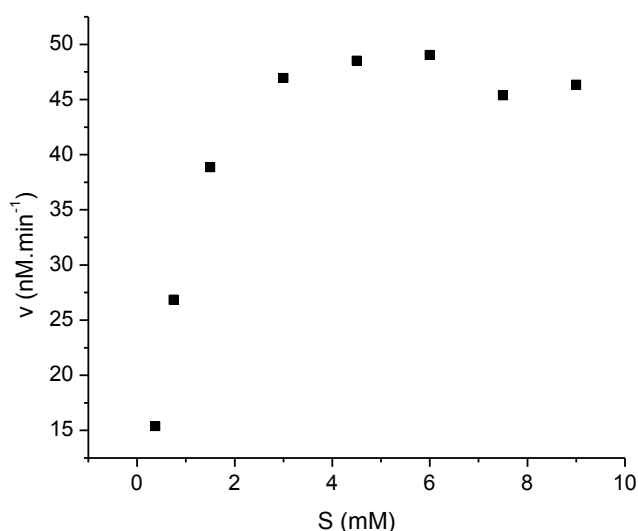


Figura 22. Representación de la cinética Michaelis-Menten de la molécula de referencia, Fabrazyme®. Se representó la velocidad de reacción ($\text{nM} \cdot \text{min}^{-1}$) como una función de la concentración de sustrato 4-MUG (mM).

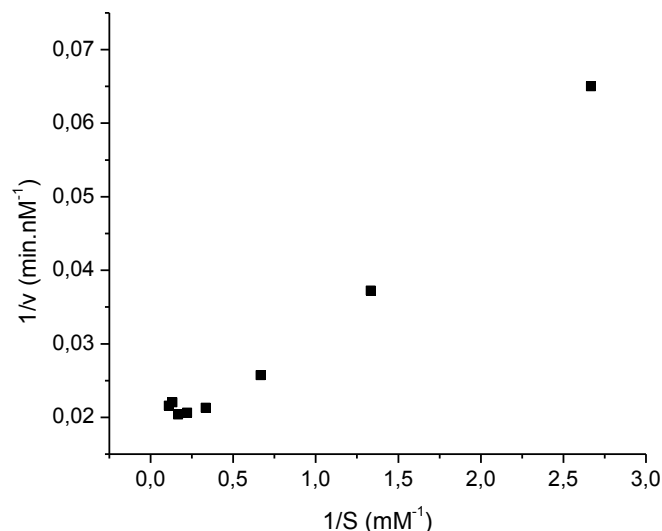


Figura 23. Gráfica de Lineweaver-Burk de la molécula de referencia, Fabrazyme®. Se representó la inversa de la velocidad de reacción (min.nM⁻¹) como una función de la inversa de la concentración de sustrato 4-MUG (mM⁻¹).

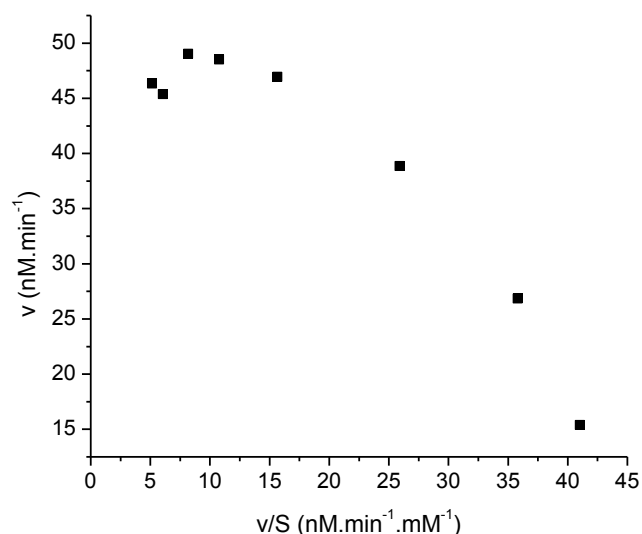


Figura 24. Gráfica de Eadie Hofstee de la molécula de referencia, Fabrazyme®. Se representó la velocidad de reacción (nM.min⁻¹) como una función del cociente entre la velocidad de reacción y la concentración de sustrato 4-MUG (nM.min⁻¹.mM⁻¹).

2.2.4. Optimización del tiempo del ensayo de actividad enzimática *in vitro*

Se realizó la determinación de la actividad enzimática *in vitro* de la enzima, incubando la misma con el sustrato fluorogénico 4MU- α -Gal durante 15, 30 y 60 min. Luego, se evaluó la sensibilidad de la respuesta a cada tiempo, observándose un incremento de la misma a mayor tiempo de incubación (Tabla 9). Sobre la base de

este resultado, se decidió trabajar a un tiempo final de 45 min, para lo cual se debió calcular nuevamente el rango lineal para dicho tiempo. En la Figura 25 se muestra la curva de calibrado de molécula de referencia, Fabrazyme®. El ensayo presentó un rango lineal entre 9 y 40 ppb (valor p asociado a prueba F ,275) y un límite de detección de 3,3 ppb.

Tabla 9. Sensibilidad de la respuesta en función del tiempo en el ensayo de actividad enzimática *in vitro*.

| Tiempo (min) | SEN (ppb ⁻¹) |
|--------------|--------------------------|
| 15 | 4,6 |
| 30 | 12,5 |
| 60 | 31,7 |

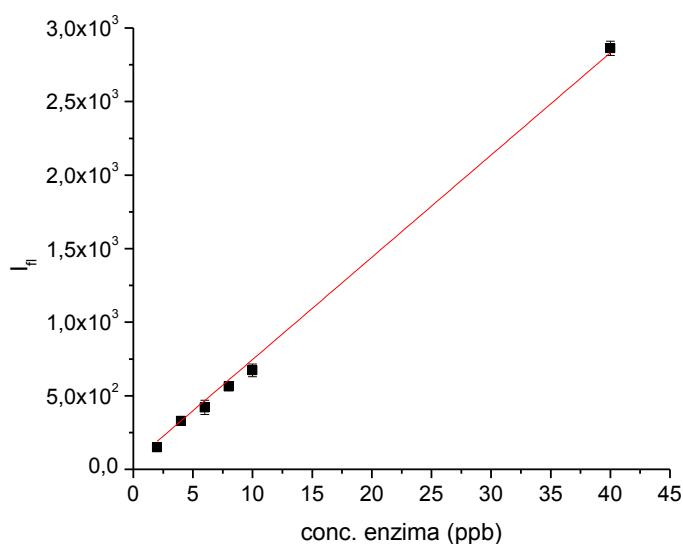


Figura 25. Curva de actividad enzimática *in vitro* de la molécula de referencia Fabrazyme® (45 min, 37°C). Se representó la respuesta del ensayo, medida como intensidad de fluorescencia (longitud de onda de excitación de 355 nm y longitud de onda de emisión de 450 nm), en función la concentración de enzima (ppb).

2.3. Determinación de Manosa-6-fosfato (M6P)

El contenido de M6P se cuantificó mediante la técnica HPAEC-PAD, empleando el sistema DIONEX ICS-5000 equipado con una columna CarboPac™ 246 PA20. La elución se llevó a cabo mediante gradiente lineal, empleando eluyente A (NaOH 100 mM) y eluyente B (AcONa 500 mM / NaOH 100 mM) durante 24 min. Se evaluaron dos condiciones de hidrólisis ácida para liberar el contenido de M6P de la proteína; a) HCl 0,1 N 1h, 80°C y b) TFA (ácido trifluoroacético) 6,25 M 1,5 h 100°C. La condición a) no fue adecuada, no observándose el pico de M6P a t= 17 min (tiempo en que eluye el

estándar M6P), mientras que en la condición b) se observa el pico a 17 min (Figura 26).

Por otro lado, se realizaron dos curvas de M6P estándar (Sigma-Aldrich): a) sin hidrolisis ácida; b) hidrolisis ácida TFA 6,25 M 1,5 h 100°C (mismo tratamiento de la muestra). Como se observa en la Figura 27, la pendiente de ambas rectas es diferente y por lo tanto, también la sensibilidad del ensayo. Se concluyó que para estimar correctamente el contenido de M6P en la muestra, será necesario realizar el mismo tratamiento tanto para el estándar como la muestra; de lo contrario, el contenido de M6P podría subestimarse.

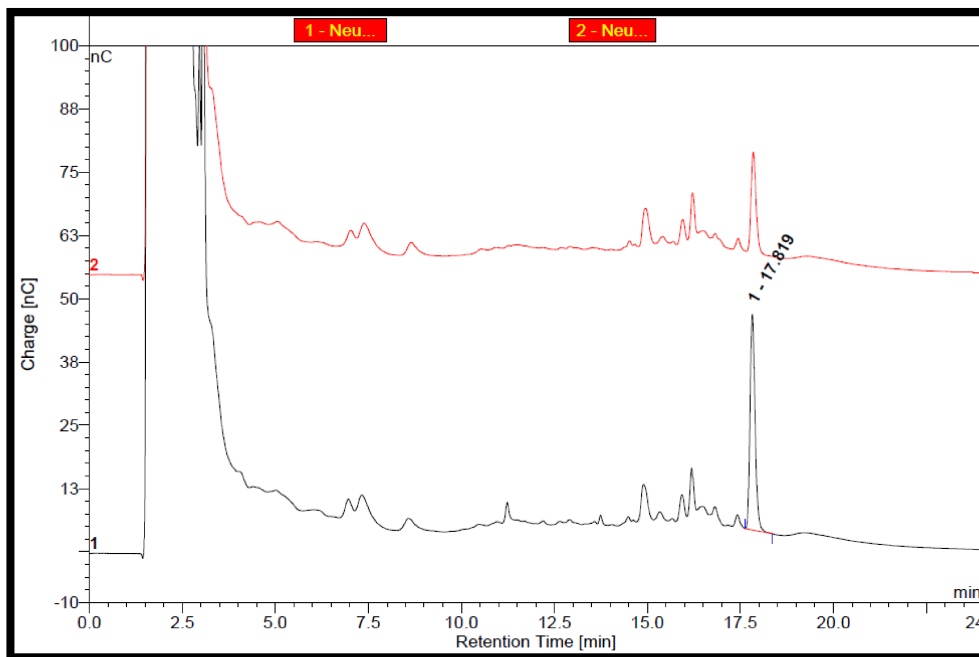


Figura 26. Cuantificación del contenido de M6P mediante HPAEC-PAD, sistema DIONEX ICS-5000. Se representó el perfil de M6P de la molécula de referencia, Fabrazyme® (rojo) y el de la molécula de referencia adicionando una cantidad conocida de M6P estándar (en negro).

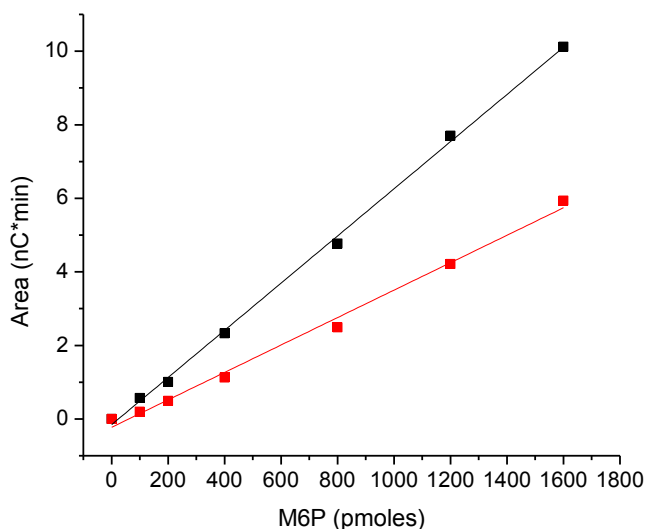


Figura 27. Curva de calibrado de estándar M6P sin tratamiento (■) y sometido a hidrólisis ácida (■). Se representó la respuesta del ensayo, medida como el área bajo la curva (nC.min), en función la cantidad inyectada (pmoles).

Se realizó una curva de calibrado con el estándar de M6P sometido a hidrólisis ácida (Figura 28) y se calcularon las cifras de mérito del método (Tabla 10).

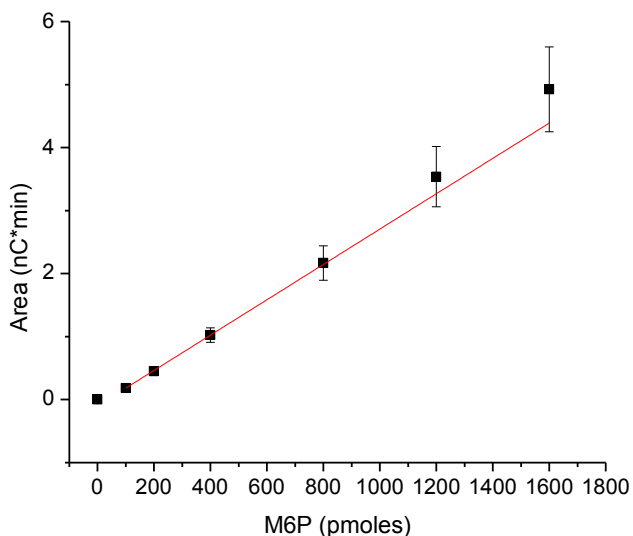


Figura 28. Curva de calibrado del estándar M6P sometido a hidrólisis ácida. Se representó la respuesta del ensayo, medida como el área bajo la curva (nC.min), en función la cantidad inyectada (pmoles).

Tabla 10. Cifras de mérito de la curva de calibrado del estándar de M6P.

| SEN (nC.min.pmol ⁻¹) | SEN _y (pmol ⁻¹) | LOD (pmol) | LOQ (pmol) | Rango Lineal (pmol) | P (Prueba F) |
|-------------------------------------|---|---------------|---------------|------------------------------|--------------------|
| 3 x 10 ⁻³ | 1,4 x 10 ⁻² | 182 | 553 | 553 1,6 x 10 ³ | ,66 |

La SEN y SEN_y de la técnica fueron bajas, lo que se pudo explicar por la necesidad de someter al estándar de M6P a hidrolisis ácida. Asimismo, considerando la ecuación 2 empleada para el cálculo de S₀, donde el término S_{fit}/A es el valor inverso de la SEN_y, fue posible explicar los valores elevados de LOD y LOQ calculados para la técnica. Sin embargo, dichos valores no se alejaron de los determinados por Zhou y col. (2002) [111], quienes reportaron un rango lineal de 200 a 2.400 pmoles de M6P.

Teniendo en cuenta que el LOQ es 553 pmol de M6P, se logró determinar que para realizar una cuantificación correcta del contenido de M6P en rhaGAL, fue necesario inyectar una masa superior a los 10 µg.

3. Ensayos de identificación

3.1. Inmunocaracterización mediante SDS-PAGE

Para la inmunocaracterización de la enzima rhaGAL se utilizó la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) seguida de *western blot*, utilizando el pAb de conejo obtenido previamente. Se evaluaron las condiciones óptimas de dicho ensayo, no siendo necesario el empleo de 2-mercaptoetanol (2-ME) ni el tratamiento previo de la muestra (calentamiento durante 3 min a 100°C) (Figura 29).

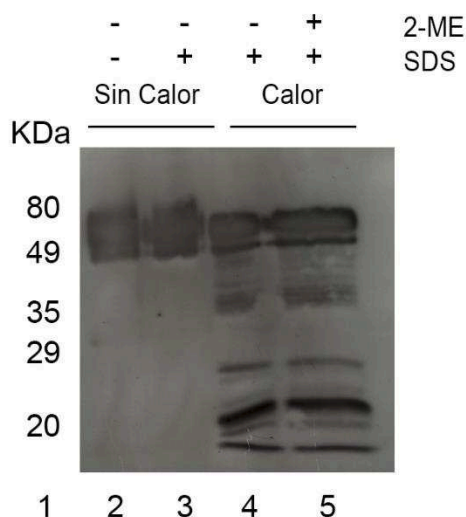


Figura 29. SDS-PAGE 12% seguido de *western blot*. Calles: 1- Marcadores de masa molecular (Bio-Rad); 2- 1 µg Fabrazyme® sin tratamiento; 3- 1 µg Fabrazyme® incubada con SDS; 4- 1 µg Fabrazyme® incubada con SDS y sometida a tratamiento térmico a 100°C; 5- 1 µg Fabrazyme® incubada con SDS y 2-ME, sometida a tratamiento térmico a 100°C.

Se observó una única banda de 50 KDa tanto en ausencia como en presencia de SDS sin tratamiento térmico, mientras que si la muestra es previamente calentada a

100°C, la misma se degradada por completo. El empleo de 2-ME resulta innecesario ya que la enzima rhaGAL no presenta puentes disulfuros intercatenarios.

3.1.1. Evaluación del límite de detección del ensayo de SDS-PAGE/western blot

Se evaluó la mínima cantidad de enzima detectable por dicho ensayo sembrando concentraciones decrecientes de la molécula de referencia Fabrazyme®, desde 1 µg a 0,001 µg totales. Se logró detectar hasta 0,005 µg totales, en las condiciones de trabajo explicadas en la sección *Materiales y Métodos* (Figura 30).

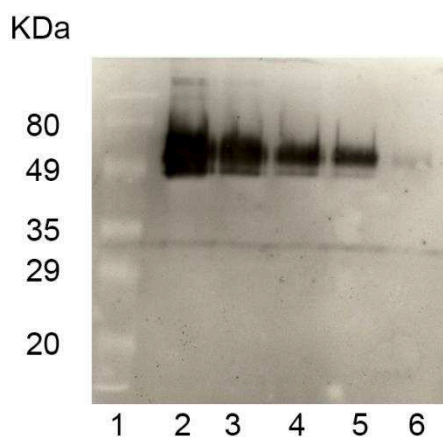


Figura 30. SDS-PAGE 12% seguido de western blot. Calles: 1- Marcadores de masa molecular (Bio-Rad); 2- 1 µg rhaGAL; 3- 0,25 µg rhaGAL; 4- 0,1 µg rhaGAL; 5- 0,05 µg rhaGAL; 6- 0,005 µg rhaGAL; 7- 0,001 µg rhaGAL.

3.2. Isoelectroenfoque

Se realizó un isoelectroenfoque seguido de tinción con colorante azul brillante *Coomasie* coloidal. Se trabajó en un rango de pH entre 3 y 10. Se observaron entre 17 a 20 isoformas, localizadas en la zona más ácida del gradiente de pH. Se empleó como molécula control un lote de rhEPO (eritropoyetina humana recombinante) (Figura 31).

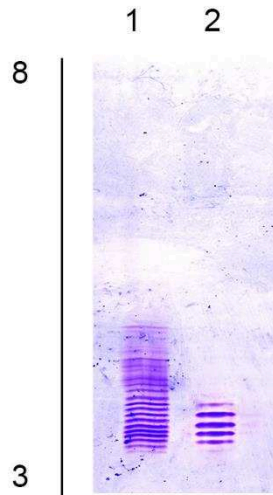


Figura 31. Isoelectroenfoque seguido de tinción con azul brillante de Coomassie.
Calles: 1- rhaGAL; 2- rhEPO. La línea indica el rango de pH empleado.

Por otro lado, se realizó un isoelectroenfoque seguido de una transferencia y posterior inmunodetección (*western blot*), sembrando concentraciones decrecientes de la molécula de referencia Fabrazyme® (5 µg a 0,1 µg totales), lográndose detectar las diferentes isoformas en todos los casos (Figura 32).

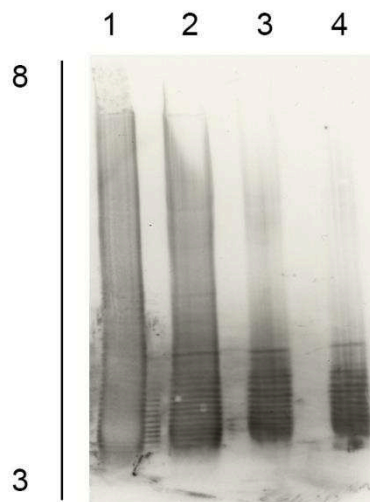


Figura 32. Isoelectroenfoque seguido de *western blot*. Calles: 1- 5 µg rhaGAL; 2- 1 µg rhaGAL; 3- 0,2 µg rhaGAL; 4- 0,1 µg rhaGAL. La línea indica el rango de pH empleado.

4. Ensayos de valoración de actividad biológica

Para que la administración exógena de rhaGAL sea efectiva en el tratamiento de la enfermedad de Fabry, la enzima debe ser captada por las células y transportada hacia los lisosomas en donde catalizará la hidrólisis de las uniones alfa-galactosídicas de los glicolípidos. Esto es llevado a cabo fundamentalmente mediante la interacción

de los residuos M6P de la enzima con los receptores de M6P de la superficie celular, lo que indica la importancia de una correcta glicosilación para que la enzima sea funcional.

Para evaluar la internalización celular de la r α GAL se utilizaron células HEK293T/17 y fibroblastos derivados de pacientes con la enfermedad de Fabry (NIGMS Coriell Institute, USA).

Para la optimización de este ensayo se utilizaron células HEK293T/17, ya que no fue posible realizar la optimización empleando fibroblastos de pacientes por tratarse de cultivos primarios y presentar una velocidad de duplicación baja. Por lo tanto, al momento de realizar la valoración de actividad biológica en fibroblastos de pacientes se emplearon las mismas condiciones determinadas para las células HEK293T/17.

Inicialmente, se evaluaron dos densidades celulares de HEK293T/17 como inóculo inicial: 1×10^4 cél.ml⁻¹ y 2×10^4 cél.ml⁻¹. El lisado celular se realizó a las 24 h post-incubación con la enzima Fabrazyme®. Para realizar el lisado se evaluaron dos condiciones: a) 4 ciclos de congelamiento-descongelamiento a -70°C (C/D) y b) lisis en baño de sonicación durante 10 min (S), empleando una dosis constante de la molécula de referencia (5 UI.ml⁻¹). De esta manera, se generaron 4 condiciones a evaluar: 1×10^4 cél.ml⁻¹ - C/D (condición 1); 2×10^4 cél.ml⁻¹ - C/D (condición 2); 1×10^4 cél.ml⁻¹ - S (condición 3) y 2×10^4 cél.ml⁻¹ - S (condición 4).

Para todos los ensayos se realizó un control con células HEK293T/17 sin la adición de enzima exógena, con el fin de evaluar la actividad enzimática basal (actividad enzimática propia de las células HEK293T/17). Se determinó la actividad enzimática *in vitro* de la molécula de referencia Fabrazyme®, y el contenido de proteínas totales, mediante el método de Bradford, en los lisados celulares a las 24 h post-incubación con la dosis de enzima.

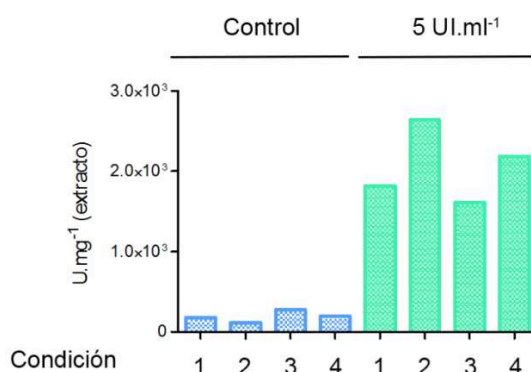


Figura 33. Actividad específica (U.mg⁻¹) en el lisado celular para cada condición ensayada (1, 2, 3 y 4). Se evaluó la actividad específica (U.mg⁻¹) en el extracto celular, luego de 24 h de incubación con 5 UI.ml⁻¹ de Fabrazyme® o en ausencia de la misma (control), en función de las distintas condiciones ensayadas.

Esta prueba permitió demostrar la factibilidad de realizar el ensayo de internalización de la enzima empleando células HEK293T/17, obteniendo valores de actividad enzimática específica de 10, 22, 5 y 11 veces superior respecto a la actividad basal para la condición 1, 2, 3 y 4, respectivamente (Figura 33). Para los siguientes ensayos de valoración, se seleccionó la condición de densidad celular inicial de 2×10^4 cél.ml⁻¹.

En una siguiente etapa, se realizó una curva dosis-respuesta entre 0 a 1 UI.ml⁻¹ (dosis) de la molécula de referencia; el lisado celular se llevó a cabo mediante 4 ciclos de congelamiento/descongelamiento (Figura 34) o incubación durante 10 min en baño de sonicación (Figura 35). En ambos casos, se observó una saturación de la respuesta cuando las células se incubaron con una dosis de 0,3 UI.ml⁻¹ de la enzima.

Paralelamente, se optimizó el número de ciclos de congelamiento-descongelamiento, obteniendo un máximo valor de actividad enzimática luego de 5 ciclos (Figura 36). Asimismo, se realizó el mismo procedimiento para el tiempo de sonicación, hallando un máximo de actividad enzimática en el lisado luego de 20 min de incubación (Figura 37). Para optimizar el tiempo de ensayo, se decidió realizar el lisado celular mediante sonicación durante 20 min, ya que para obtener similares niveles de actividad enzimática mediante ciclos de congelamiento-descongelamiento se requieren aproximadamente 120 min.

Considerando los resultados anteriores, se realizó una curva dosis-respuesta entre 0 y 0,3 UI.ml⁻¹ de Fabrazyme®, realizando la lisis celular mediante sonicación durante 20 min (Figura 38). Se determinó una respuesta lineal hasta 0,3 UI.ml⁻¹ (valor prueba F asociado= ,84). Dosis superiores a 0,3 UI.ml⁻¹ demostraron una saturación de la respuesta (Figura 39), lo que podría explicarse por una saturación de los receptores de M6P presentes en membrana plasmática.

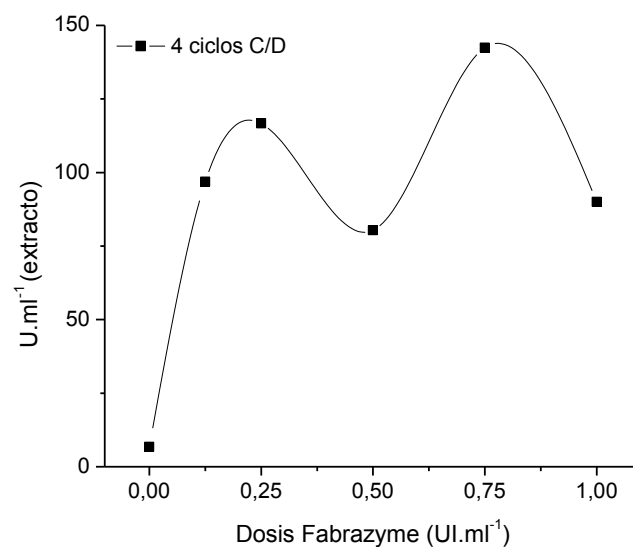


Figura 34. Valoración de la actividad enzimática en extracto de células HEK293T/17, realizando la lisis celular mediante de 4 ciclos C/D. Se representa la actividad enzimática (U.ml⁻¹) medida en el extracto celular en función de la dosis de Fabrazyme® adicionada al cultivo (UI.ml⁻¹).

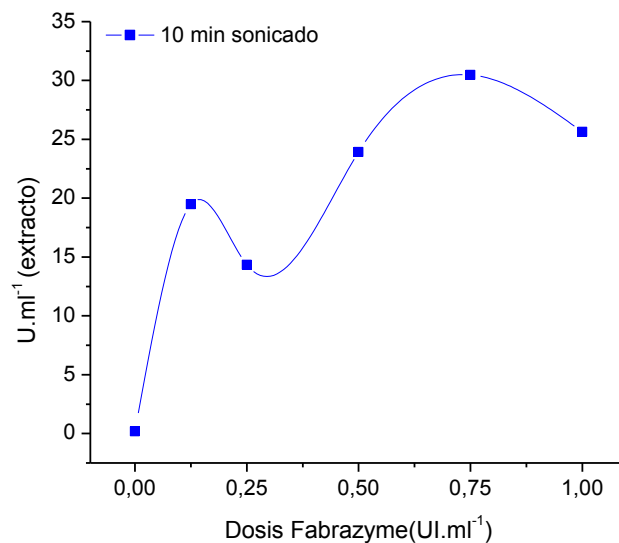


Figura 35. Valoración de la actividad enzimática en extracto de células HEK293T/17, realizando la lisis celular mediante sonicación durante 10 min. Se representa la actividad enzimática (U.ml⁻¹) medida en el extracto celular en función de la dosis de Fabrazyme® adicionada al cultivo (UI.ml⁻¹).

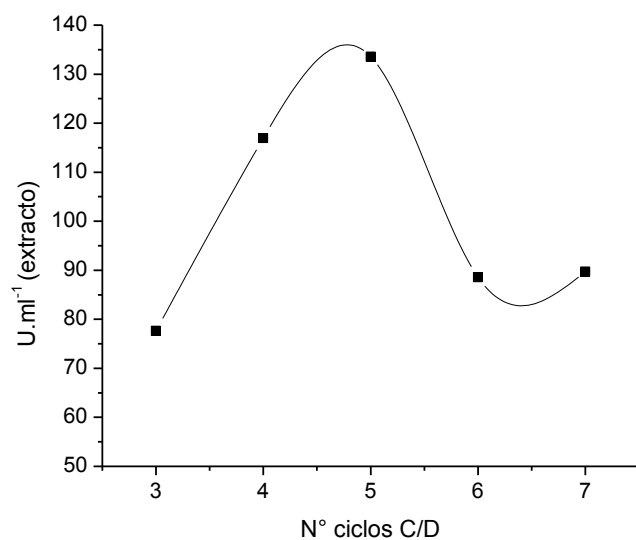


Figura 36. Actividad enzimática en el extracto celular (U.ml⁻¹) en función del número de ciclos de C/D.

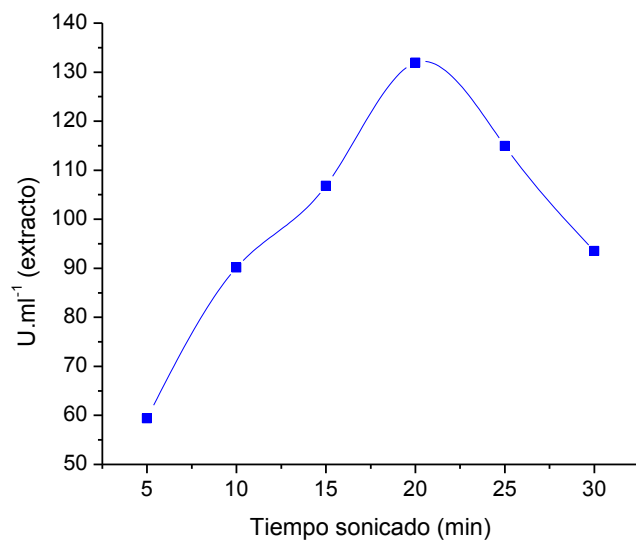


Figura 37. Actividad enzimática en el extracto celular (U.ml⁻¹) en función del tiempo de sonicación (min).

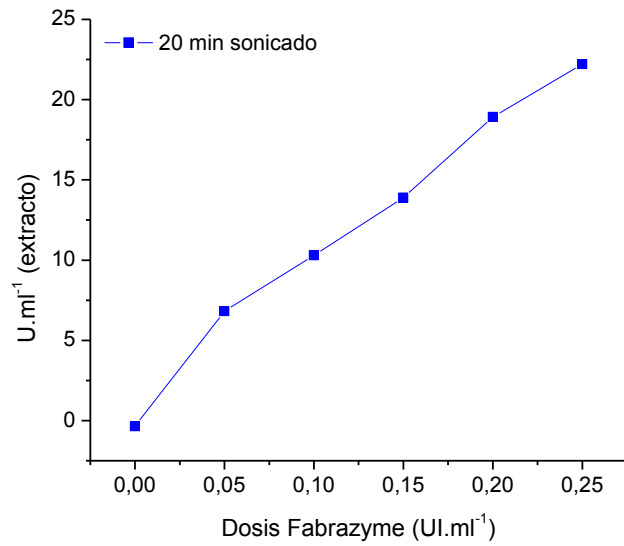


Figura 38. Valoración de la actividad enzimática en extracto de células HEK293T/17, realizando la lisis celular mediante sonicación durante 20 min. Se representa la actividad enzimática (U.ml⁻¹) medida en el extracto celular en función de la dosis de Fabrazyme® adicionada al cultivo (UI.ml⁻¹).

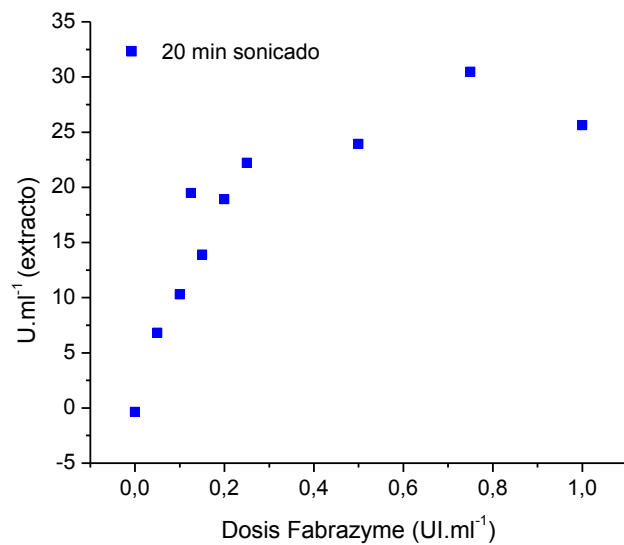


Figura 39. Valoración de la actividad enzimática en extracto de células HEK293T/17, realizando la lisis celular mediante sonicación durante 20 min. Se representa la actividad enzimática (U.ml⁻¹) medida en el extracto celular en función de la dosis de rhαGAL adicionada al cultivo (UI.ml⁻¹).

5. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

En una primera etapa, la disponibilidad de un suero anti-rhαGAL obtenido en conejo posibilitó el diseño y validación de un ensayo de ELISA sándwich para la cuantificación de la enzima. El ensayo presentó un rango lineal entre 0,5 y 50 ng.ml⁻¹ (p asociado a Prueba F: ,31) y un límite de detección de 0,17 ng.ml⁻¹. No se observó efecto matriz debido a variaciones en los diferentes medios en los que se diluyó la enzima, no viéndose alterado el paralelismo de las curvas ni la reacción de detección. Los valores de CV obtenidos fueron aceptables (≤ 20 %) [112]. Así, se desarrolló un sistema simple, rápido y específico que permite cuantificar la enzima en los diferentes estadios del proceso de producción.

En paralelo, se desarrolló un método de medición de la actividad enzimática *in vitro*. La curva de calibrado de 4-MU presentó un rango lineal entre $1,9 \times 10^{-3}$ y 6×10^{-3} mM (p asociado a Prueba F: ,20) y un límite de detección de $6,0 \times 10^{-4}$ mM. El procedimiento demostró adecuados valores de CV (≤ 20 %). Sólo se observó efecto matriz en el medio EX-CELL® 302 condicionado por el crecimiento de células CHO-K1s *wt*. Sin embargo, se logró resolver este problema mediante la construcción de una curva de adición estándar. Asimismo, se optimizó el tiempo del ensayo y se estimaron los parámetros cinéticos de la enzima.

Por otro lado, fue necesario desarrollar y optimizar un método de cuantificación de M6P mediante la técnica HPAEC-PAD, empleando el sistema DIONEX ICS-5000. Se identificaron las condiciones óptimas de tratamiento de la muestra y el estándar. El procedimiento demostró un límite de detección de 182 pmol, con un rango lineal comprendido entre 553 y $1,6 \times 10^3$ pmol (p asociado a Prueba F: ,66).

Por otra parte, utilizando el pAb anti-rhαGAL obtenido en el laboratorio, se pusieron a punto ensayos de identificación mediante SDS-PAGE o IEF (Isoelectroenfoque) seguidos de inmunodetección (*western blot*).

La optimización del ensayo de valoración de la actividad biológica *in vitro* se realizó utilizando cultivos de células HEK293T/17 para, en una etapa posterior, aplicar este ensayo a cultivos de fibroblastos de pacientes con la enfermedad de Fabry. El mismo demostró mayor sensibilidad cuando el experimento se llevó a cabo con 2×10^4 cél.ml⁻¹ durante 24 h, obteniendo una respuesta lineal hasta 0,3 UI.ml⁻¹ (p asociado a Prueba F: ,84).

RESULTADOS PARTE 2

“Generación de líneas y clones celulares recombinantes. Cultivo en alta densidad”

Como se ha discutido en secciones anteriores, entre las células animales, las células CHO son las más utilizadas para el desarrollo de bioterapéuticos.

La productividad (por célula) se puede incrementar sincronizando el cultivo en la fase G₁ del ciclo celular. Sin embargo, este procedimiento normalmente se halla asociado a una reducción en la velocidad de crecimiento del cultivo. Una forma de resolver dicho problema es realizar un cultivo que conste de dos fases: una de crecimiento y otra de producción. En general, décadas de investigación han sido dedicadas a mejorar la productividad volumétrica de proteínas recombinantes de uso terapéutico, enfocadas en la optimización de la productividad celular o la densidad del cultivo mediante manipulación genética o química (por ejemplo, a través del empleo de moléculas como el butirato de sodio) [113] o la simple reducción de la temperatura del cultivo (por ejemplo, de 37°C a 32-31°C) [4].

Por otro lado, la habilidad de adaptar muchos tipos celulares al crecimiento en suspensión y el uso de aditivos poliméricos que reduzcan el estrés por cizallamiento (rozamiento) han propiciado el desarrollo de cultivos celulares en suspensión. Actualmente, el uso de medio libre de SFB representa una gran ventaja en el proceso de producción de proteínas recombinantes, reduciendo los costos, garantizando la reproducibilidad lote a lote y aumentando la eficiencia del protocolo de purificación. Asimismo, la capacidad de adaptar las células a crecer en suspensión es altamente deseable, ya que facilita el escalado pudiendo emplear biorreactores tipo tanque agitado [96]. Por el contrario, el empleo de cultivos celulares adaptados al crecimiento en adherencia presenta problemas relacionados al escalado ya que se requiere optimizar la relación superficie/volumen de manera de maximizar las densidades celulares alcanzadas. El biorreactor más utilizado en este tipo de cultivos es el biorreactor con microesferas en tanque agitado. Asimismo, las impurezas provenientes del sistema de cultivo representan un aspecto clave a evaluar: algunos contaminantes como virus o priones pueden ser transferidos a partir de los componentes de origen animal derivados del medio de cultivo, mayormente utilizados en los sistemas de cultivos adherentes y no así en cultivos en suspensión [114].

Con el objetivo de expresar y producir la enzima rhaGAL, se construyeron vectores de expresión convencionales (plásmidos) y vectores de tipo lentiviral de tercera generación para su posterior incorporación al genoma de las células CHO-K1.

A continuación se detallan los experimentos llevados a cabo para cumplir dicho objetivo.

1. Obtención de la secuencia codificante de rhαGAL. Generación de vectores de expresión plasmídicos y lentivirales

1.1. Construcción de vectores de expresión productores de rhαGAL

Se solicitó a la empresa GENEART la secuencia sintética codificante de rhαGAL, optimizada para su expresión en células CHO-K1 (vector p-rhGal F). Posteriormente, se construyeron los diferentes vectores de expresión utilizando técnicas de ingeniería genética. A continuación se resumen los pasos realizados para la construcción de los vectores de expresión PLV EF1 rhGal F y pZC CMV rhGal F.

1.1.1. Vector de expresión pLV EF1 rhGal F

Se digirió el vector pEF-1α [23] con las enzimas de restricción *NheI* y *BamHI* y el vector p-rhGAL F (GENEART) (Figura 40) con las enzimas de restricción *XbaI* y *BamHI* (Promega). Los productos de digestión purificados se ligaron con T4 ADN Ligasa (Invitrogen) y luego se transformaron células *E. coli* TOP 10 competentes. Los clones recombinantes fueron analizados por digestión con la enzima de restricción *SaI* (Figura 41). El vector resultante se denominó pLV EF1 rhGal F (Figura 42).

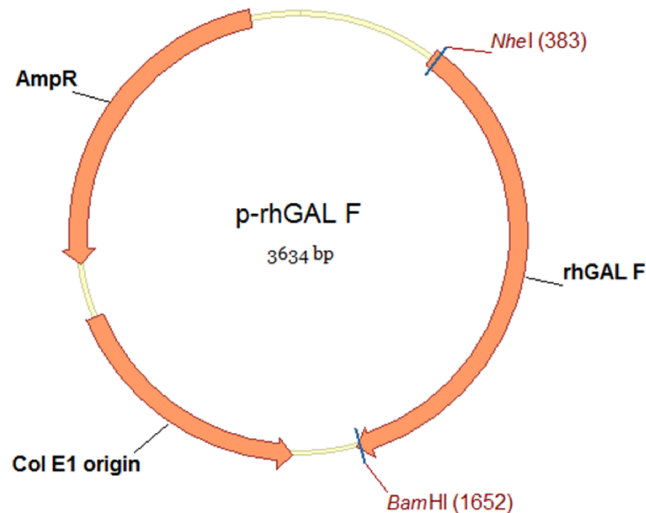


Figura 40. Representación esquemática del vector p-rhGAL F.

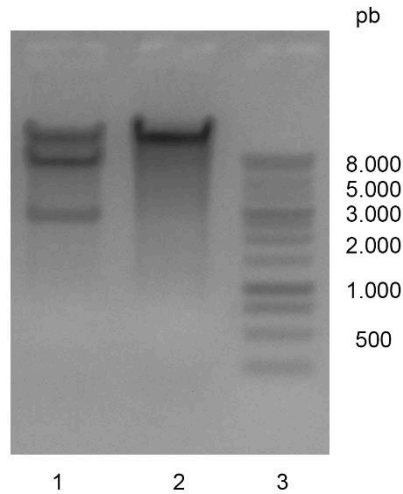


Figura 41. Screening de clones recombinantes. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) de los productos de minipreparación de ADN y digestión con la enzima *SalI*. Calles: 1- Clon recombinante; 2- Clon no recombinante; 3- Marcador de masa molecular 1 kpb *Bench Top DNA Ladder* (Promega).

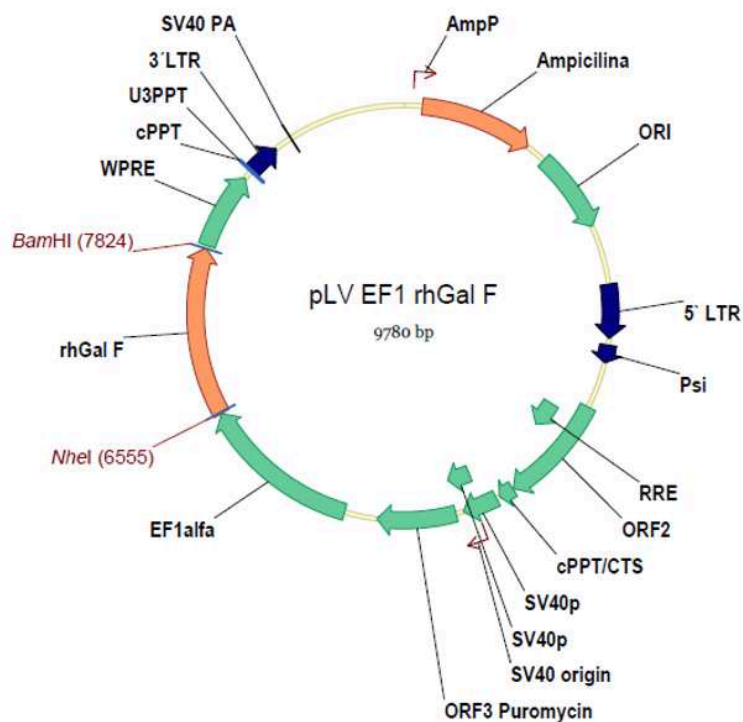


Figura 42. Representación esquemática del vector pLV EF1 rhGalF.

1.1.2. Vector de expresión pZC CMV rhGal F

Inicialmente, se digirió el vector pCMV [23] y el vector pLV EF1 rhGal F con las enzimas de restricción *NheI* y *BamHI*. Los productos de digestión purificados se ligaron con T4 ADN Ligasa y luego se transformaron células *E. coli* TOP 10 competentes. Los clones recombinantes fueron analizados por digestión con la enzima

de restricción *SalI* (Figura 43). El vector resultante se denominó pZc CMV rhGal F (Figura 44).

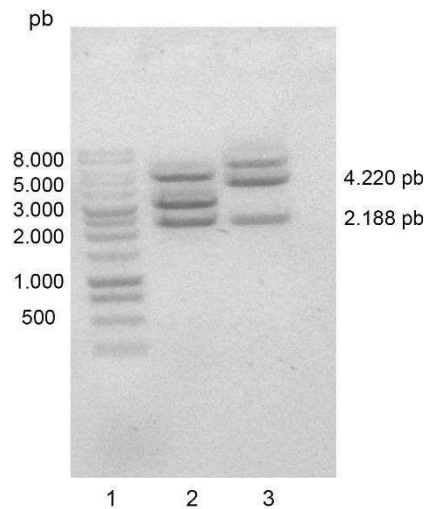


Figura 43. Screening de clones recombinantes. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) de los productos de minipreparación de ADN y digestión con la enzima *SalI*. Calles: 1- Marcador de masa molecular 1 kpb *Bench Top DNA Ladder* (Promega); 2- Vector pCMV; 3- Clon recombinante.

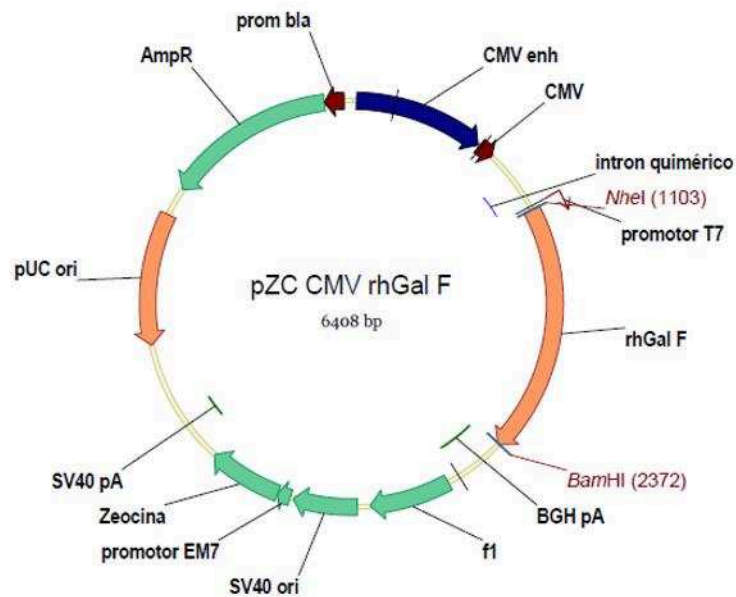


Figura 44. Representación esquemática del vector pZC CMV rhGalF.

2. Generación de líneas celulares productoras de rhGAL

2.1. Generación de líneas celulares mediante transfección

Se generaron líneas celulares mediante transfección transitoria de células CHO-K1 adherentes empleando Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen). Se efectuaron tres transfecciones sucesivas. Para generar líneas celulares estables se realizó una presión de selección con antibiótico zeocina (Zeo) (Invitrogen). Conforme el número de

transfecciones aumentó, la concentración de antibiótico tolerada por las células fue mayor. Una vez terminado el proceso de selección se retiró el antibiótico del medio de cultivo y se mantuvieron las células en medio no selectivo durante 7 días.

Se evaluaron las productividades de cada población mediante técnica de ELISA sándwich y recuento celular. Dichos valores se calcularon mediante la ecuación 16 de la sección *Materiales y Métodos*. De este modo, la concentración de la proteína presente en el sobrenadante se expresó afectando la misma por la cantidad de células presentes en cultivo y por el tiempo de producción. Como se muestra en la Tabla 11 y la Figura 45, la productividad se incrementó en forma concomitante al número de transfecciones realizadas. Sin embargo, estos valores resultaron bajos y por lo tanto inadecuados para una posterior producción a escala piloto. Por este motivo, se realizó un clonado celular, como se explica en el apartado 6.10 de la sección *Materiales y Métodos*. El mejor clon que se obtuvo mediante esta estrategia demostró una productividad de $2,5 \text{ pg.cél}^{-1}.\text{día}^{-1}$.

Tabla 11. Valores de productividad de líneas celulares ($\text{pg.cél}^{-1}.\text{día}^{-1}$).

| Línea celular | Productividad ($\text{pg.cél}^{-1}.\text{día}^{-1}$) | Nº Transfección |
|---------------------------------------|---|-----------------|
| CHO _{adh} GAL TF1 (200 Zeo) | 0,3 | 1 |
| CHO _{adh} GAL TF2 (1000 Zeo) | 0,9 | 2 |
| CHO _{adh} GAL TF3 (2000 Zeo) | 1,5 | 3 |

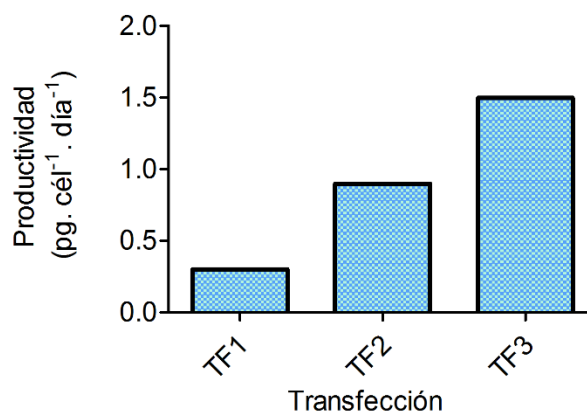


Figura 45. Productividad de rhoGAL ($\text{pg.cél}^{-1}.\text{día}^{-1}$) en función del número de transfecciones (TF1, TF2, TF3).

2.2. Generación de líneas celulares mediante transducción

2.2.1. Obtención de vectores lentivirales (LVs) codificantes de rhoGAL

Se generaron vectores lentivirales (LVs) de tercera generación por transfección transitoria de células HEK293T/17 utilizando tres plásmidos empaquetadores o estructurales: pRSV-REV, pMD.G y pMDLg/pRRE y el vector de transferencia pLV EF1 rhGal F. Se utilizó Lipofectamine™ 2000 para la transfección y luego de 48 h de cultivo se cosecharon los sobrenadantes y se concentraron por ultracentrifugación durante 3 h a 65.000 *g*. Finalmente, los LVs concentradas se almacenaron a -70°C hasta su utilización. Uno de los viales conteniendo los LVs fue empleado para la titulación.

2.2.2. Determinación del título de LPs

Para la determinación del título de partículas lentivirales se empleó el *kit* de titulación *QuickTiter™ LentivirusTiter Kit (Lentivirus-Associated HIV p24)* (CellBiolabs). Este *kit* fue diseñado para detectar únicamente la proteína p24 del virus del HIV que se encuentra asociada a partículas. La titulación se efectuó a partir de un estándar de proteína p24 recombinante provisto con el *kit*.

El protocolo empleado para la titulación se detalla en el apartado 6.7.2.3 de la sección *Materiales y Métodos*. La curva de calibrado generada con el estándar de proteína p24 recombinante se muestra en la Figura 46. También se evaluaron en esta instancia un control negativo (sobrenadante condicionado por el crecimiento de células HEK293T/17) y un blanco de reactivos (solución tampón diluyente en ausencia de antígeno), para evaluar la interacción inespecífica de los reactivos.

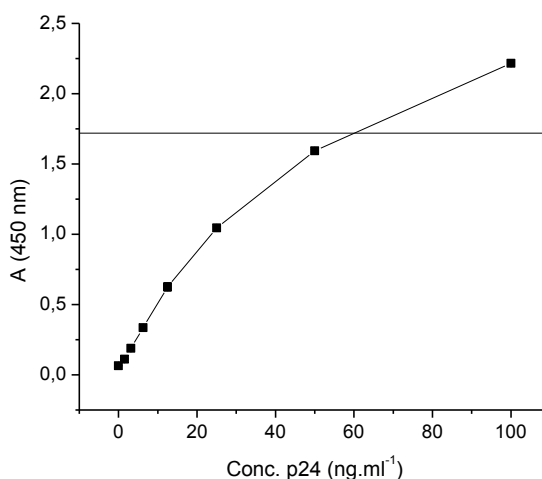


Figura 46. Curva de calibrado de proteína p24. Titulación de LV-rhGAL. Se representó la respuesta del ensayo, medida como la absorbancia a $\lambda=450$ nm, en función la concentración de proteína p-24 (ng.ml⁻¹). La línea horizontal indica el punto de interpolación en la curva de calibrado.

En todos los casos, tanto el blanco de reactivos como el control negativo presentaron una absorbancia mínima, indicando ausencia de reacción inespecífica y

de detección de proteína p24 en sobrenadantes de cultivo no transfectados, respectivamente.

Por interpolación en la curva de calibrado fue posible obtener el valor de concentración de proteína p24 en los sobrenadantes conteniendo los LVs. Sobre la base de las ecuaciones planteadas en la sección *Materiales y Métodos* y del valor de concentración obtenido, fue posible calcular el título de partículas lentivirales en los sobrenadantes, expresado como UT.ml⁻¹. En la Tabla 12 se indican los valores de absorbancia para las muestras, la correspondiente concentración de proteína p24 y la cuantificación de partículas expresadas como LPs.ml⁻¹ y UT.ml⁻¹.

Tabla 12. Cálculo del título de LVs.

| LPs | A _{450 nm} | Conc. p24* (ng.ml ⁻¹) | Título LPs (LP.ml ⁻¹) | Título de UT# (UT.ml ⁻¹) |
|-----------|---------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---|
| LV-rhαGAL | 1,7 | 1,5 x 10 ³ | 1,9 x 10 ¹⁰ | 1,9 x 10 ⁸ |

*Concentración de proteína p24 asociada a LPs.

UT (Unidad de transducción),

2.2.3. Generación de líneas celulares productoras de rhαGAL por transducción con LVs

Si bien los vectores lentivirales son capaces de transducir tanto células quiescentes como en división, las células a modificar se cultivaron a una densidad relativamente baja, de modo de no alterar el ciclo de duplicación celular normal y favorecer así la entrada de las mismas en división mitótica y, por lo tanto, un estado activo de la cromatina que permita la recombinación del genoma lentiviral con el de la célula. Por otro lado, una concentración celular reducida aseguraría la disponibilidad de un número mayor de partículas lentivirales por célula, incrementando así la probabilidad de contacto y de ingreso a las mismas.

Las líneas celulares CHO-K1 adherentes (CHO-K1adh) y CHO-K1 en suspensión (CHO-K1s) se transdujeron con LVs conteniendo la secuencia rhαGAL. En cada caso, se realizaron tres transducciones sucesivas (TD1, TD2, TD3) a una multiplicidad de infección de ~ 35 UT por célula. Posteriormente, se evaluaron las productividades de rhαGAL de cada población celular mediante ELISA sándwich y actividad enzimática específica. Para ello, las células CHO-K1adh se cultivaron en placas a una densidad de 4 x 10⁵ cél.ml⁻¹, se cosecharon los sobrenadantes a las 24 h y se almacenaron a -20°C hasta su utilización. Se procedió de igual modo para las células CHO-K1s, partiendo de una densidad celular de 7 x 10⁵ cél.ml⁻¹. La

productividad celular se calculó mediante la ecuación 16. En paralelo, se evaluó la actividad enzimática *in vitro* de cada línea.

En ambos casos se evidenció que un incremento en el número de transducciones se tradujo en un aumento de la productividad celular y la actividad enzimática específica (Figura 47). De esta forma, podría suponerse que las células incorporaron un mayor número de copias de TG codificante de la enzima luego de cada evento de transducción, lo cual se tradujo en una mayor concentración de la enzima en el sobrenadante. De esta manera, se observó un incremento de productividad de hasta 7 veces para la línea celular CHO-K1adh y de 2,3 veces para la línea celular CHO-K1s. Es de relevancia destacar que en todos los casos no se observó disminución de la viabilidad celular, a pesar de los tres eventos de transducción. Análogamente, se puede inferir que la capacidad de síntesis de proteína recombinante tampoco se vio afectada negativamente ante una sobreexpresión del TG. El empleo de vectores lentivirales permite un incremento en los niveles de producción proteica debida principalmente a dos razones: 1) su capacidad de lograr un elevado número de copias de TG por genoma celular a partir de múltiples rondas de transducción; 2) en general, presentan una gran afinidad de integración en regiones transcripcionalmente activas del genoma. Estas propiedades representan una mejora respecto al empleo de sistemas plasmídicos, los cuales implican una integración aleatoria en el genoma celular y en un único sitio. Spencer y col. (2011) [40] reportaron la generación de líneas BHK productoras de FVIII recombinante mediante transducciones sucesivas con partículas lentivirales, obteniendo un incremento en la productividad y en el número de copias provirales con el aumento del número de transducciones.

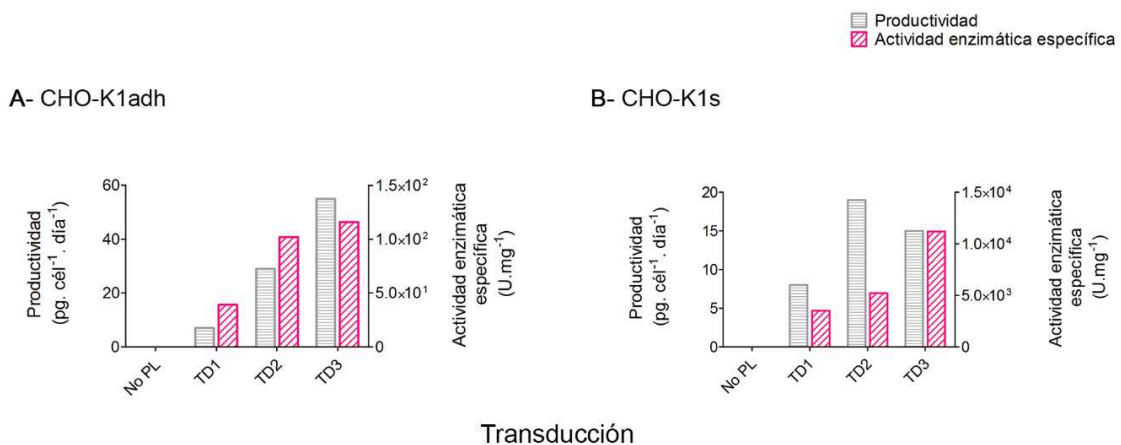


Figura 47. Productividad y actividad enzimática específica de rhaGAL en función del número de eventos de transducción (TD1, TD2, TD3) para las líneas CHO- K1adh y CHO-K1s.

A su vez, se comenzó con la inmunocaracterización de las líneas, realizando un SDS-PAGE seguido de *western blot*. En todos los casos, se observó una banda de alrededor de 50 KDa coincidente con la masa molecular de la molécula seleccionada como referencia Fabrazyme®. Por otra parte, la molécula derivada de las líneas celulares adherentes presentó una migración diferencial con respecto a secretada por las líneas con crecimiento en suspensión, lo que podría deberse a la presencia de ASB uno de los principales componentes de los medios de cultivo para crecimiento en adherencia. La ASB tiene un peso molecular cercano al de la enzima (aproximadamente 66 KDa), lo que podría retrasar la migración de la proteína de interés en este tipo de ensayos (Figura 48).

A partir de las productividades calculadas y los ensayos de control de calidad realizados, se seleccionaron las líneas recombinantes CHO_{adh} GAL TD3 y CHO_s GAL TD3. Las mismas se sometieron a un proceso de selección gradual con el antibiótico puromicina, de manera de enriquecer el cultivo con aquellas células que presentan una mayor expresión de las proteínas de interés [115].

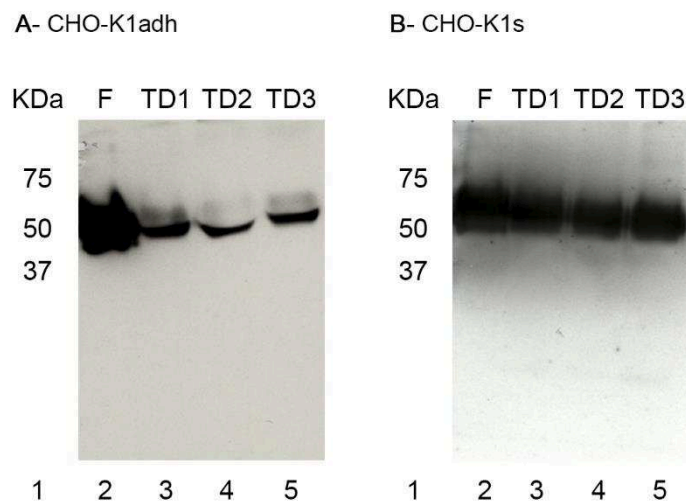


Figura 48. Caracterización de los sobrenadantes de cultivo de las líneas productoras de rhaGAL CHO-K1adh (A) y CHO-K1s(B), mediante SDS-PAGE/ *western blot*. Calles: 1- Marcadores de masa molecular (Bio-Rad); 2- Molécula de referencia Fabrazyme®; 3- CHO GAL TD1; 4- CHO GAL TD2; 5- CHO GAL TD3.

La línea celular CHO_{adh} GAL TD3 se sometió a presión de selección con 10 µg.ml⁻¹ de puromicina hasta que no se encontraron células viables en el control de

muerte celular (aproximadamente 48 h). Luego se incrementó la concentración de puromicina a 25, 50 y 100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Seguidamente se tomaron los cultivos resistentes a 100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ del antibiótico y se incubaron con concentraciones de puromicina de 200 y 300 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Una vez terminado el proceso de selección se retiró el antibiótico del medio de cultivo y se mantuvieron las células en medio no selectivo durante 7 días. Finalmente, se realizó un ensayo comparativo de productividad, en donde las diferentes líneas celulares generadas fueron cultivadas durante 24 h. Al finalizar este período de cultivo se cosecharon los sobrenadantes y se analizaron por ELISA sándwich.

Se procedió de manera similar con la línea denominada CHO_s GAL TD3, iniciando la presión de selección con 2 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de puromicina hasta que el control de muerte celular reveló una viabilidad nula (aproximadamente 48 h). Luego se incrementó la concentración de puromicina a 5, 10, 15, 25 y 50 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$. Posteriormente, sobre la base de los valores de productividad, se seleccionaron las líneas celulares a las que se denominó CHO_{adh} GAL Td3 300 y CHO_s GAL TD3 50, con valores de productividad (48 h) de 36 $\text{pg}.\text{cél}^{-1}.\text{día}^{-1}$ y 10 $\text{pg}.\text{cél}^{-1}.\text{día}^{-1}$, respectivamente.

Paralelamente, se continuó la inmunocaracterización de dichas líneas mediante isoelectroenfoque seguido de *western blot*. Se observó que las enzimas producidas por ambas líneas celulares presentaron perfiles de glicosilación similares a los de la enzima de referencia, aunque con una mayor proporción de isoformas ácidas (Figura 49).

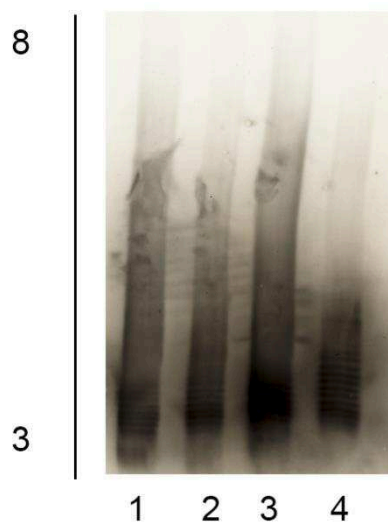


Figura 49. Isoelectroenfoque/*western blot* de los sobrenadantes de cultivo de las líneas productoras seleccionadas. Calles: 1- CHO_{adh} GAL TD3 (0,5 μg); 2- CHO_s GAL TD3 (0,5 μg); 3- CHO_s GAL TD3 (1 μg); 4-

Molécula de referencia Fabrazyme®. La línea indica el rango de pH empleado.

Posteriormente, se llevó a cabo el proceso de adaptación de la línea celular denominada CHO_{adh} GAL TD3 300 para su crecimiento en suspensión, en medio libre de SFB. A continuación se detalla dicho procedimiento.

3. Adaptación de la línea CHO_{adh} GAL TD3 300 al crecimiento en suspensión

Para lograr la adaptación de la línea se partió de un cultivo en condición de adherencia (medio DMEM/Ham's-F12 5% SFB, medio A). Cuando el cultivo se encontraba en fase exponencial de crecimiento (concentración celular próxima a $5-6 \times 10^5$ cél.ml⁻¹) se realizó un subcultivo a una densidad de 4×10^5 cél.ml⁻¹ utilizando una mezcla de medio A y medio EX-CELL® 302 (medio B) en una proporción volumétrica 50:50 (2,5% SFB, condición A). El cultivo se mantuvo en esta condición hasta observar que el mismo se adaptó, demostrando un crecimiento adecuado que conduce a un estado de confluencia y, simultáneamente, de células que se van desprendiendo y crecen formando agregados celulares, motivo de la disminución de concentración del SFB. Asimismo, se evaluó la morfología celular y la presencia de detritos celulares. Luego de considerar que el cultivo en la condición anterior se encontraba adaptado, se reiteró el procedimiento de subcultivo a una densidad de 4×10^5 cél.ml⁻¹ empleando sucesivamente proporciones volumétricas de medio de cultivo A y B de 25:75 (1,25% SFB, condición B), 15:85 (0,75% SFB, condición C) y 10:90 (0,5% SFB, condición D). Al alcanzar la última condición de adaptación, el cultivo se encontró en su mayor proporción en suspensión, por lo que las células se subcultivaron a una densidad de 4×10^5 cél.ml⁻¹ empleando sólo medio de cultivo B. Finalmente, se realizaron sucesivos subcultivos en 100% de medio B (0% SFB, condición E) de manera de alcanzar la adaptación definitiva de la línea en el medio libre de SFB, denominada CHO_a GAL TD3 300. A partir de la condición 100%, los cultivos se realizaron en frascos *Schott* sometidos a agitación orbital a 160 rpm.

Luego de cada etapa de subcultivos y cambio a la siguiente proporción de medios, se realizaron resguardos que se continuaron durante todo el proceso de adaptación.

En la Figura 50 se observa el tiempo total en el que se mantuvieron los cultivos en los diferentes estadios de adaptación y el número de pasajes transcurridos durante todo el proceso de adaptación. El tiempo total de adaptación fue de 48 días.

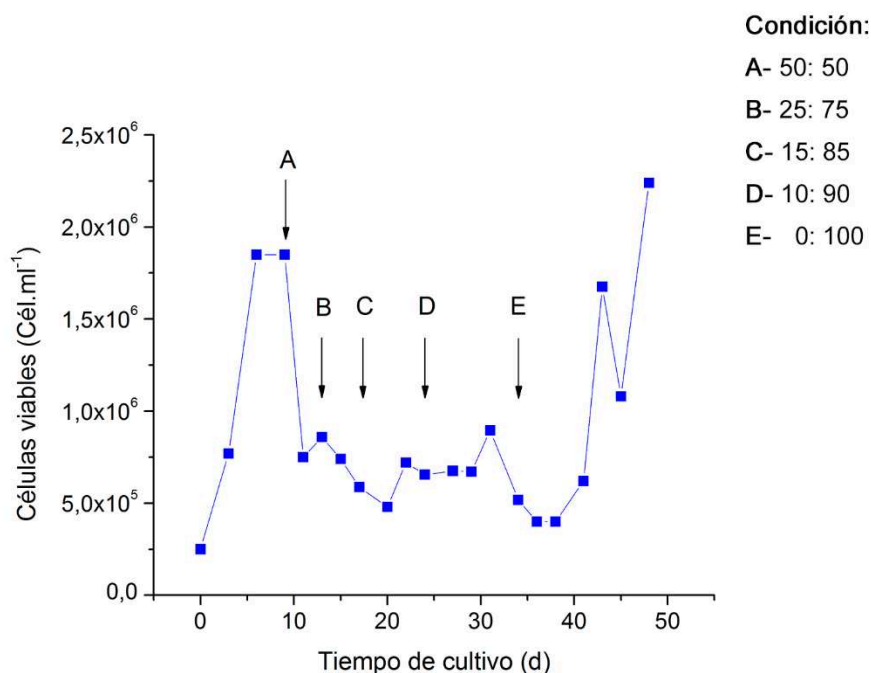


Figura 50. Tiempo de cultivo en los diferentes estadios de adaptación y sus correspondientes concentraciones de células viables.

Durante el proceso de adaptación, las células se desprenden y crecen formando agregados celulares, motivo de la disminución de concentración del SFB. En el estadio 90:10, se observó la formación de pequeños agregados celulares y la deposición de los mismos en el fondo y paredes del frasco. En el cultivo finalmente adaptado estos agregados desaparecieron y las células crecieron sin formar agregados, como se observa en la Figura 51.

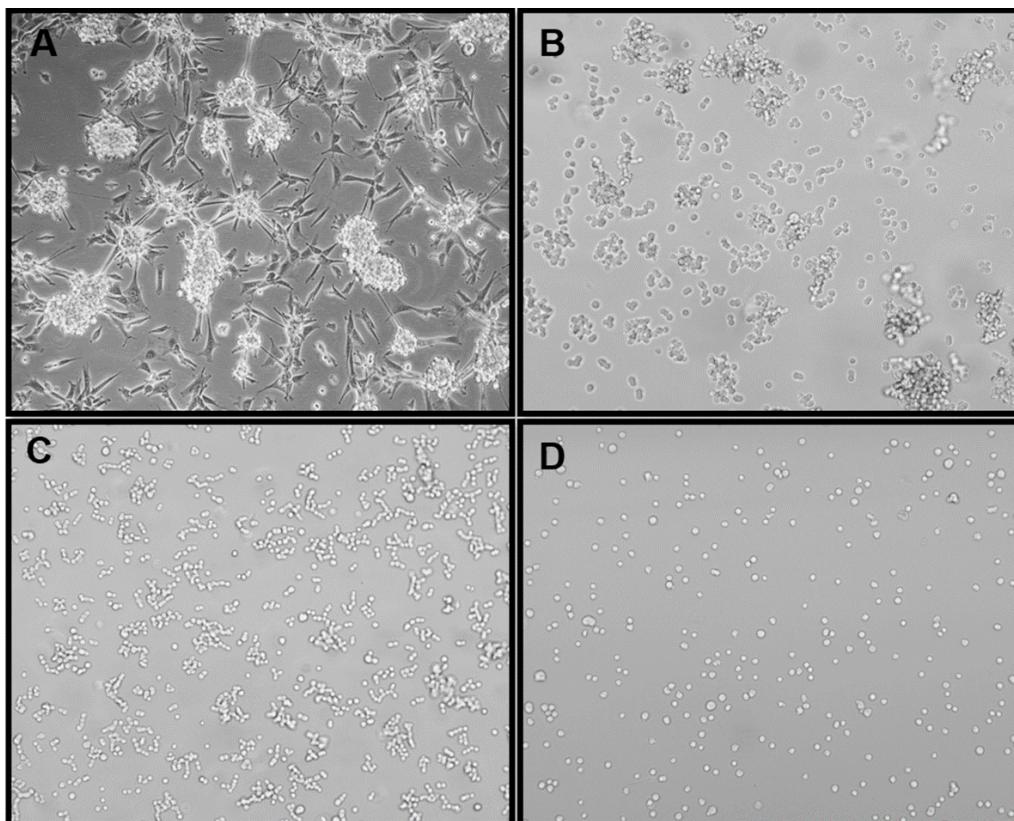


Figura 51. Variación morfológica durante el proceso de adaptación a crecimiento en suspensión de la línea CHO_{adh} GAL TD3 300, mediante microscopía óptica (10X). Condición B (A); condición C (B) condición D (C); condición E (CHO_a GAL TD3 300) (D).

Una vez finalizado el proceso de adaptación de la línea celular, se determinó la productividad de r α GAL de manera de evaluar el efecto del protocolo de adaptación sobre la misma. Para ello, se realizó un ensayo de productividad comparativo, en donde las líneas CHO_{adh} GAL TD3 y CHO_a GAL TD3 fueron cultivadas durante 24 h. Al finalizar este período de cultivo se cosecharon los sobrenadantes y se analizaron por ELISA sándwich. Así, se pudo determinar que la línea adaptada al crecimiento en suspensión evidenció una disminución de la productividad de r α GAL de 2,4 veces en relación a la correspondiente a la línea con crecimiento en adherencia (12 pg. cél⁻¹. día⁻¹ versus 5 pg. cél⁻¹. día⁻¹; productividad 24 h). Es por ello que se decidió continuar con la caracterización de la línea celular generada a partir de las células CHO-K1s (CHO_s GAL TD3 50).

4. Clonado de la línea celular CHO_s GAL TD3 50

Se realizó el clonado de la línea celular para lo cual se sembraron 4 placas de 96 pozos, a razón de 200 μ l por pozo, con una suspensión celular de 10 cél.ml⁻¹ en medio

EX-CELL® 302 suplementado con 10% SFB, con el objetivo de obtener pozos en los que se deposite una única célula.

Cuando los cultivos llegaron a una densidad celular adecuada, los pozos que presentaron un único clon se seleccionaron y amplificaron para posteriores ensayos de selección. Se seleccionaron 15 clones, cuyos sobrenadantes fueron evaluados mediante técnica de ELISA sándwich para determinar la productividad de rhaGAL y la actividad enzimática específica (Figura 52).

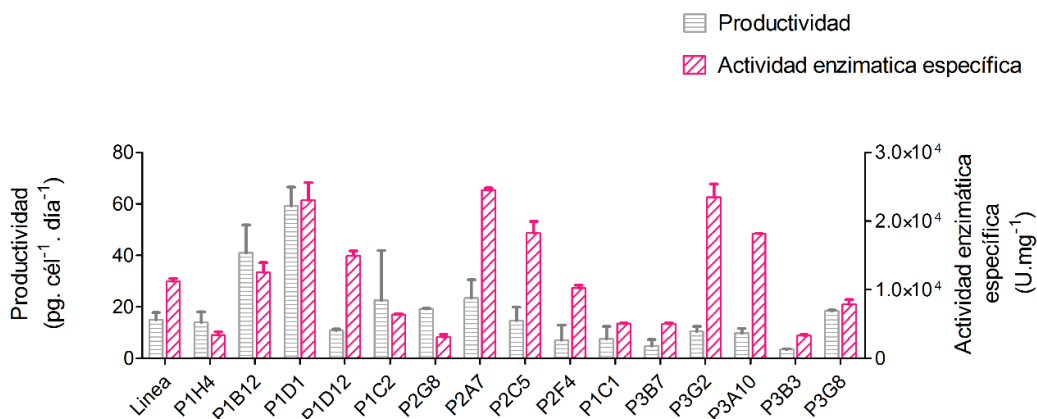


Figura 52. Productividad y actividad enzimática específica de rhaGAL de los distintos clones analizados. Para cada clon se evaluó la productividad y actividad enzimática específica de rhaGAL. Los valores reportados son un promedio de dos mediciones \pm SD.

Se obtuvieron clones con productividades de rhaGAL entre $3,5 \pm 0,2$ y 59 ± 7 pg.cél⁻¹.día⁻¹ y valores de actividad enzimática específica entre $3,1 \times 10^3 \pm 400$ a $2,45 \times 10^4 \pm 300$ U.mg⁻¹ ($0,05$ a $0,4$ UI.mg⁻¹). Se seleccionó uno de los clones con mejores características (10 ± 2 pg.cél⁻¹.día⁻¹ y $2,4 \times 10^4 \pm 2 \times 10^3$ U.mg⁻¹), para proceder al análisis de su crecimiento y metabolismo.

5. Caracterización de la línea celular CHO_s GAL TD3 50 y el clon P3G2

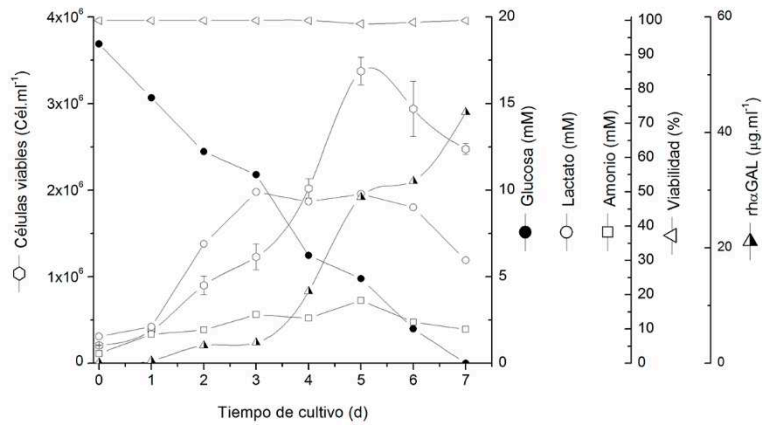
Los sobrenadantes de cultivos correspondientes a la línea celular CHO_s GAL TD3 50 y al clon P3G2 derivado de la misma se caracterizaron por isoelectroenfoque seguido de *western blot* (Figura 53). Tanto la línea celular como el clon presentaron un perfil de glicosilación similar a la molécula de referencia Fabrazyme®, pero con una mayor proporción de isoformas ácidas.



Figura 53. Análisis del patrón de isoformas de diferente punto isoeléctrico y su distribución a lo largo del gradiente de pH establecido en ensayos de IEF. Se comparó el patrón de isoformas tanto de la línea celular como del clon productor seleccionado entre sí y con respecto a la molécula de referencia. Calles: 1- Molécula de referencia Fabrazyme®; 2- Línea celular CHO_s GAL TD3 50; 3- Clon P3G2. La línea indica el rango de pH empleado.

Por otro lado, se determinó la velocidad de crecimiento de cada cultivo y la cinética de producción/consumo de distintos metabolitos. Para realizar las curvas de crecimiento se partió de un cultivo en fase exponencial de crecimiento, preparando una suspensión celular de concentración 3×10^5 cél.ml⁻¹. Esta suspensión fue cultivada en frascos *Schott* de 50 ml con un volumen de trabajo de 25 ml. Diariamente se tomó una muestra de 0,5 ml de cultivo realizándose el recuento de células viables y totales. El sobrenadante libre de células se conservó a -20°C, con el fin de determinar posteriormente la concentración de glucosa, lactato, amonio y rhaGAL. La Figura 54 muestra la variación en la concentración de las especies en estudio (células viables, viabilidad, glucosa, lactato, amonio y rhaGAL) en función del tiempo de cultivo. Asimismo, se determinaron las velocidades específicas de consumo y producción de metabolitos, graficando la variación en la concentración de la especie en estudio en función de la integral de células viables (ICV). El valor de la pendiente de la recta de ajuste determina las diferentes velocidades específicas (Tabla 13).

CHOs GAL TD3 50



Clon P3G2

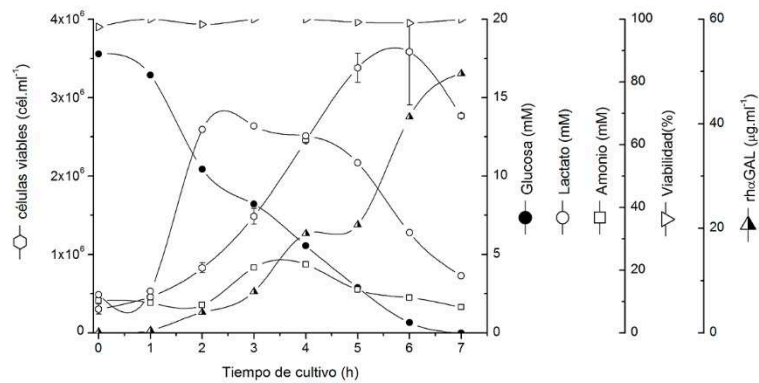


Figura 54. Curvas de variación de concentración de células viables, viabilidad, concentración de glucosa lactato amonio y rhαGAL.

Tabla 13. Valores de μ , q_{gluc} , q_{lac} , q_{amon} y q_{enz} , obtenidos para la línea celular CHO_s GAL TD3 50 y el clon P3G2.

| | Línea | Clon |
|---|---------|---------|
| μ (h ⁻¹) | 0,003 | 0,005 |
| $q_{glucosa}$ (pmol.cel ⁻¹ .h ⁻¹) | -0,025 | -0,140 |
| $q_{lactato}$ (pmol.cel ⁻¹ .h ⁻¹) | 0,060 | 0,020 |
| q_{NH4+} (pmol.cel ⁻¹ .h ⁻¹) | 0,009 | 0,020 |
| $q_{rh\alpha GAL}$ (pmol.cel ⁻¹ .h ⁻¹) | 0,00004 | 0,00005 |

En términos de concentraciones celulares, los dos cultivos alcanzaron densidades superiores a 3×10^6 cél.ml⁻¹. La viabilidad se mantuvo por encima del 95% durante las fases de crecimiento exponencial y estacionario, disminuyendo sólo en la fase de muerte. Tanto la línea celular como el clon P3G2 presentaron un crecimiento similar. En cuanto a la producción de rhαGAL se observó una concentración acumulada similar (40 µg.ml⁻¹). Con respecto al consumo de glucosa, se observó que

la misma fue totalmente consumida durante el experimento, llegando a concentraciones no detectables el último día de cultivo. En todos los cultivos, la concentración de lactato se mantuvo por debajo de $1,2 \text{ g.l}^{-1}$ (13,3 mM). Esto último resulta importante ya que el lactato ejerce un efecto tóxico a concentraciones superiores de 20-30 mM, variando el pH y la osmolaridad del medio [116]. Asimismo, hacia el final del cultivo se evidenció un consumo de lactato, lo cual se encuentra directamente relacionado con el agotamiento de glucosa como fuente de carbono. El amonio alcanzó una concentración máxima de alrededor de 4 mM tanto para la línea celular como para el clon P3G2. Existen diferentes consecuencias de la acumulación elevada de este metabolito en el medio de cultivo (superior a 4 mM), dentro de las que se puede mencionar la reducción de la velocidad específica de crecimiento, inducción de diferentes mecanismos de apoptosis o necrosis o alteraciones en el perfil de glicosilación [117]. Por otra parte, se observó una remetabolización del amonio alrededor del día 6. Una posible explicación sería la utilización del amonio en la síntesis de aminoácidos como la alanina y el aspartato (como un mecanismo de detoxificación), o de otras especies nitrogenadas que podrían haber sido depletadas del medio de cultivo.

6. Producción. Cultivo en biorreactor

6.1. Línea CHO_s GAL TD3 50

La línea celular CHO_s GAL TD3 50 se cultivó en un biorreactor Biostat Q-plus (Sartorius) de 1 l de volumen de trabajo, con régimen de perfusión de 1 vol. día⁻¹, utilizando medio de cultivo libre de suero (EX-CELL® 302). Las células se cultivaron durante 14 días, alcanzándose densidades celulares superiores a $1 \times 10^7 \text{ cél.ml}^{-1}$ y viabilidades mayores a 90% (Figura 55). La temperatura del sistema fue modificada entre 37°C y 31°C, obteniendo concentraciones de r α GAL en el orden de los $60 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ en 10 l de cosecha. Este tipo de sistema de cultivo no sólo permite mantener los niveles de glucosa y lactato constantes, sino también garantizar la obtención de un producto de alta calidad.

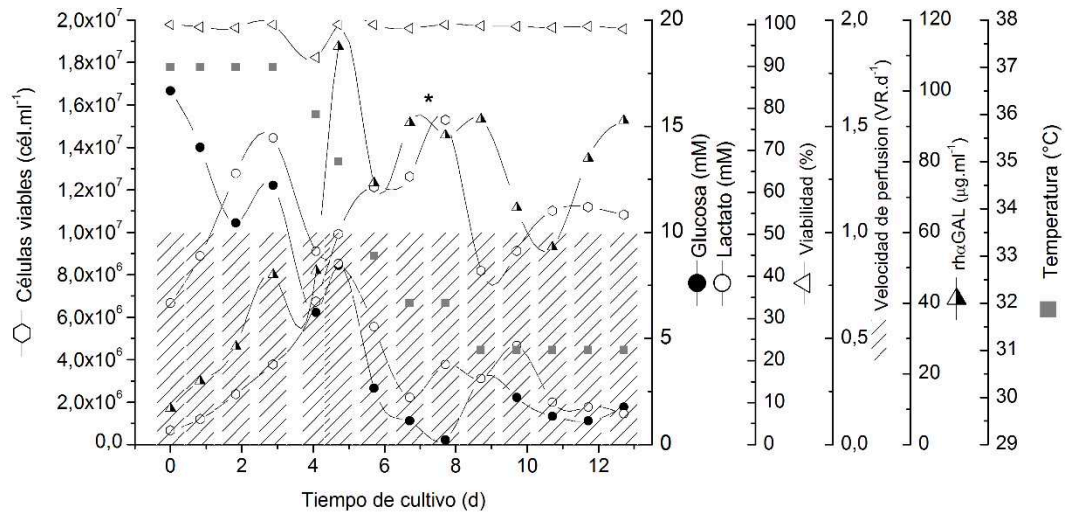


Figura 55. Cultivo de la línea celular CHO_s GAL TD3 en un biorreactor de 1 l. Evolución de la concentración de células viables, viabilidad, concentración de lactato y glucosa y volumen perfundido en el tiempo. *Sangrado biorreactor.

Estos resultados permiten demostrar la robustez de la línea seleccionada para su cultivo en biorreactor de tipo tanque agitado y la capacidad de dicha línea de producir niveles de la proteína de interés elevados y estables en el tiempo.

6.1.1. Análisis de número de copias de TG

La capacidad de la línea celular de producir niveles elevados de proteína de interés podría deberse a que el TG de interés se haya insertado en un punto caliente (*hotspot*) del genoma celular o bien que se hayan incorporado más de una copia del TG por genoma celular. Un modo de corroborar esta hipótesis es realizar un ensayo de qPCR o PCR en tiempo real por técnica de cuantificación absoluta, el cual permite determinar un número aproximado de copias insertadas por genoma celular. Dicha técnica relaciona la señal obtenida (ct) con el número de copias fijo mediante una curva de calibrado. La curva de calibrado se realizó con un vector lentiviral *pLV EF1 rhGal F*. La extracción de ADN genómico se realizó utilizando el *kit* GENOMIC-tip 20/G QIAGEN, diseñándose cebadores para una secuencia específica que se encuentra en todas las líneas productoras construidas a partir de dichos vectores lentivirales.

Como resultado de la cuantificación se determinó un promedio de 43 ± 2 copias de TG de interés por genoma celular. Este valor sería congruente con los elevados valores de productividad de *rhuGAL* de la línea generada y permitiría confirmar la hipótesis planteada anteriormente.

6.2. Clon P3G2

El clon P3G2 se cultivó en medio libre de SFB en un biorreactor de 1 l en modo de perfusión durante 14 días, alcanzando densidades celulares de hasta $1,8 \times 10^7$ cél.ml⁻¹ con viabilidades celulares de 95%. La velocidad de perfusión varió entre 0,5 y 1,0 volúmenes de reactor por día. Se alcanzaron concentraciones de hasta 35 µg.ml⁻¹ de rhoGAL en ~ 10 l de cosecha (Figura 56).

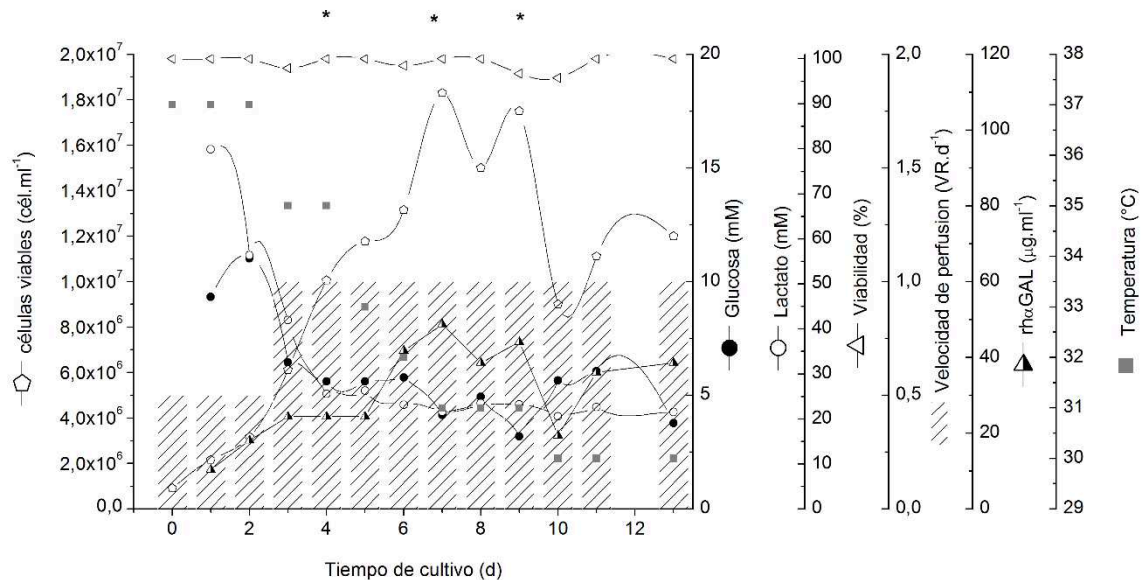


Figura 56. Cultivo del clon P3G2 en biorreactor de 1 l. Evolución de la concentración de células viables, viabilidad, concentración de lactato y glucosa, volumen perfundido y temperatura en el tiempo. *Sangrado biorreactor.

6.2.1. Análisis de número de copias de TG

Para determinar el número de copias de TG en el clon productor P3G2 se procedió de igual manera que lo realizado para la línea celular de la cual deriva, determinándose un valor de $2,2 \pm 0,1$ copias de TG por genoma celular. A pesar de encontrarse un menor número de copias del TG, el clon mantuvo elevados niveles de producción, similares a los de la línea celular. Esto podría atribuirse al hecho de que la inserción del TG se produjo en un sitio cromosómico altamente estable y es especialmente deseable porque simplifica la identificación posterior de los sitios de inserción del TG en la línea celular que se utilizará en el proceso de producción final.

Por otra parte, para asegurar que el banco de células maestro es seguro para uso terapéutico, la detección de contaminantes derivados de LVs es esencial. Es importante destacar que no se identificaron copias de componentes derivados de LVs en $1,0 \times 10^4$ copias del genoma en la línea celular productora de rhoGAL ni en el clon que deriva de ella.

7. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Se obtuvieron líneas celulares recombinantes CHO-K1 que expresan la enzima rhαGAL en sobrenadantes de cultivo mediante transfección con plásmidos y transducción con lentivirus de tercera generación. Posteriormente, se seleccionaron las células recombinantes mediante presión con un antibiótico. En el primer caso, se obtuvieron líneas adherentes con bajas productividades de la enzima. Aún luego de realizar tres eventos de transfección, selección y clonado, las productividades no fueron adecuadas para el uso de dichas líneas en un proceso de producción. Por este motivo, se llevó a cabo la generación de líneas recombinantes mediante tres transducciones sucesivas de células CHO-K1 adherentes y CHO-K1 adaptadas a crecer en suspensión, empleando vectores lentivirales de tercera generación. En ambos casos, se evidenció un aumento de la productividad celular y la actividad enzimática específica en forma concomitante con el incremento en el número de transducciones.

Se realizó una inmunocaracterización mediante SDS-PAGE seguido de *western blot*, a partir del cual se observó, en todos los casos, una banda de alrededor de 50 KDa coincidente con la masa molecular de la molécula de referencia Fabrazyme®. El perfil de isoformas, analizado mediante IEF seguido de *western blot*, también resultó similar.

Posteriormente, las líneas celulares expuestas a tres eventos de transducción fueron sometidas a presión de selección con antibiótico de manera gradual, alcanzando mayores niveles de productividad.

En una primera instancia, se seleccionó la línea celular CHO_{adh} GAL TD3 300. Sin embargo, la misma debió someterse a un proceso de adaptación a crecimiento en suspensión con el fin de facilitar el posterior escalado del cultivo y el desarrollo del proceso de purificación. No obstante, luego de 48 días de adaptación a medio libre de suero, la productividad de rhαGAL disminuyó notablemente, por lo que no se continuó con la caracterización de esta línea celular.

Con el objetivo de obtener un clon productor que permita estandarizar el proceso de producción, se realizó el clonado de la línea CHO_s GAL TD3 50. Se obtuvo un panel de 15 clones con valores de productividad de rhαGAL entre 3,5 y 59 pg.cél.⁻¹.día⁻¹ y valores de actividad enzimática específica entre $3,1 \times 10^3$ a $2,45 \times 10^4$ U.mg⁻¹.

En condiciones *batch*, tanto la línea celular como el clon seleccionado (P3G2), alcanzaron densidades superiores a 3×10^6 cél.ml⁻¹. La viabilidad se mantuvo por encima del 95% durante las fases de crecimiento exponencial y estacionario, disminuyendo sólo en la fase de muerte. Esto resulta importante ya que un desarrollo eficiente del proceso de cultivo celular para la producción de glicoproteínas

recombinantes debe maximizar la productividad celular así como el rendimiento y la calidad del producto, y, al mismo tiempo, minimizar el tiempo del proceso y los costos globales.

El número de copias de TG en el clon P3G2 se determinó mediante qPCR, indicando la existencia de $2,2 \pm 0,1$ copias del transgén, en comparación con las 43 ± 2 copias de la población de células de la que deriva (línea CHO_s GAL TD3 50). Es importante destacar que no se identificaron copias de componentes derivados de LVs en $1,0 \times 10^4$ copias del genoma de la línea celular ni del clon productor de rhGAL.

Finalmente, se debe resaltar la capacidad tanto de la línea celular como del clon de ser cultivados de forma continua, pudiendo de esta manera prolongarse en el tiempo la producción de la enzima, garantizando a su vez la calidad y estabilidad del producto.

En la siguiente sección se describirá el desarrollo del proceso de purificación que permitirá obtener la enzima activa y pura.

RESULTADOS PARTE 3

“Desarrollo de una metodología de purificación de rhaGAL a partir de sobrenadantes de cultivo”

Las drogas convencionales son pequeñas moléculas químicas con un peso molecular definido, entre 50 y 1.000 Da. Por el contrario, los productos biofarmacéuticos son proteínas grandes, complejas y heterogéneas con pesos moleculares entre 5 a 200 KDa. Asimismo, los productos proteicos muestran una gran sensibilidad hacia el proceso de fabricación empleado, pudiendo ser afectados tanto por la célula huésped como en los distintos pasos del proceso de producción. Las proteínas pueden degradarse incluso durante pasos posteriores al protocolo de purificación por congelamiento-descongelamiento, formulación, filtración o liofilización. Cualquier impureza originada en estos pasos puede contribuir a la disminución de la potencia y/o aumento de la inmunogenicidad del producto final [118].

Los procesos *downstream* representan entre un 45 a un 92% del costo total del proceso de producción. No sólo es importante optimizar los pasos de cultivo sino que resulta indispensable contar con un protocolo de purificación adecuado que garantice que todas las impurezas sean eliminadas permitiendo contar con cantidades suficientes de proteína altamente pura [119].

Generalmente, un proceso *downstream* se encuentra dividido en cuatro etapas (recuperación, concentración, purificación y formulación), con pasos definidos, dependiendo de la localización del producto (intracelular o extracelular) y de la pureza requerida. El principal objetivo de los pasos de recuperación implica separar las partes proteicas y no proteicas de la muestra, generalmente mediante un método físico de clarificación (filtración o centrifugación) o bien, por extracción celular. Además, si la muestra se halla diluida es necesario concentrarla. La purificación propiamente dicha consiste en tres grandes pasos: captura (concentración y aislamiento de la proteína de interés), purificación intermedia (remoción del mayor número de contaminantes) y pulido (*polishing*) (remoción de trazas de impurezas, impurezas relacionadas, agregados). Finalmente, la formulación permite obtener el producto en la presentación adecuada, adicionando muchas veces agentes que permitan estabilizar o aumentar la vida media del producto.

El grado de pureza a lograr depende del uso final del producto proteico. Las proteínas disponibles comercialmente se pueden clasificar en aditivos alimenticios o nutricionales, farmacéuticos o bioterapéuticos, enzimas para uso industrial o diagnóstico. Generalmente, aquellas proteínas destinadas a uso terapéutico son las que requieren un grado mayor de pureza, superior a 99%. Dentro de los principales

aspectos técnicos a resolver en la purificación, se pueden mencionar: bajas concentraciones de la muestra inicial, complejidad de la muestra, presencia de contaminantes críticos (es importante diferenciar entre aquellas impurezas que deben ser removidas y aquellas que se puedan tolerar), estabilidad del producto o requerimientos del producto final (potencia, actividad o pureza). De esta manera, es importante aprovechar las diferencias en las propiedades fisicoquímicas existentes entre la muestra de interés y los contaminantes [120].

Se suele clasificar a las impurezas dentro de tres grandes grupos:

1. Impurezas relacionadas al producto: aquellas variantes que difieren del producto buscado que suelen generarse durante la síntesis en la célula o en los subsiguientes pasos del proceso de producción o almacenamiento, pudiendo generar un daño físico o químico. Una modificación química puede producir una alteración en la estructura proteica mediante oxidación, desaminación o hidrólisis, mientras que un daño físico se genera principalmente por agregación proteica.
2. Impurezas relacionadas al proceso: componentes celulares y materiales adicionados al proceso, tales como *leachables* (lixiviables) de las columnas cromatográficas, ADN, lípidos o HCPs (*Host Cell Proteins*, proteínas relacionadas del huésped).
3. Contaminantes (especies que no deben estar presentes en el crudo o muestra de partida, como virus o priones) [121, 122].

En el caso particular de la enzima $\rho\alpha$ GAL, se encuentra reportado que la purificación involucra una serie de múltiples pasos cromatográficos, incluyendo cromatografía de intercambio iónico e hidrofóbica [105, 123]. Asimismo, la proteína $\rho\alpha$ GAL se caracteriza por presentar un pI de 3,7 y un pH óptimo de 4,6 (rango de pH óptimo de 3,5-7,5). Por lo tanto, se propuso como paso inicial de purificación una cromatografía de intercambio iónico (IEX), seguido de un segundo paso de purificación por cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC). En todos los casos se determinaron las condiciones óptimas para la fase de adsorción y elución de manera de lograr la máxima recuperación y pureza de la enzima.

1. Desarrollo del primer paso de purificación de $\rho\alpha$ GAL

La cromatografía de intercambio iónico (IEX) resulta un paso cromatográfico útil como primera etapa en un protocolo de purificación ya que permite la captura de la proteína y remoción de parte de los contaminantes. Es una de las cromatografías más

usadas como primera etapa de captura, fundamentalmente en aquellos casos en que la proteína no presenta ninguna etiqueta o *tag* (que permita su purificación) o no se trate de un anticuerpo. Las proteínas, al ser moléculas anfotéricas, interaccionarán con los grupos funcionales unidos a la resina dependiendo del pH de la solución y la concentración de iones móviles. Este tipo de resinas presenta una gran resolución bajo condiciones suaves con una alta capacidad de unión. Los intercambiadores pueden ser aniónicos (cargados positivamente) o catiónicos (cargados negativamente). A su vez, estos pueden ser débiles o fuertes en función de su capacidad de mantener la carga en soluciones de pH extremos. La elución proteica se puede realizar modificando el pH o la fuerza iónica de la solución. Sin embargo, debido a que la reproducibilidad por cambio de pH es menor, fundamentalmente al trabajar a mayores escalas, se suele utilizar una elución por cambio de fuerza iónica (gradiente salino). Para seleccionar el tipo de sal a emplear se deberá considerar el efecto *salting out* (o *salting in*) de la sal sobre la proteína (serie de Hofmeister), dado por su valencia, y la unión de los iones a dicha proteína (lo que explica las diferentes propiedades de elución de sales con la misma valencia). Generalmente se suele utilizar una sal con menor efecto *salting out*, como el NaCl, que una de mayor efecto, como el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, ya que estas últimas generan una mayor fuerza de unión de la proteína a la resina dificultando el proceso de elución. Normalmente, antes de comenzar la purificación por IEX se requiere realizar un paso previo de remoción celular y restos celulares (*debris*) [119].

Los ensayos iniciales para la puesta a punto de dicha cromatografía se realizaron empleando sobrenadantes crudos de la línea celular CHO_s GAL TD3 50 (~0,6 UI.mg⁻¹ de rhGAL) cultivada en medio libre de suero (EX-CELL® 302). Esto presenta como principal ventaja que la enzima de interés se encuentra en un medio con menor cantidad de contaminantes proteicos. Entre los principales contaminantes a remover se pueden mencionar a aquellos derivados del medio de cultivo (rojo fenol, proteínas de PM < 10 KDa, Pluronic F68-detergente no iónico-, glutamina, bicarbonato de sodio), así como también posibles partículas virales.

Antes de comenzar el protocolo de purificación, se filtró el sobrenadante de cultivo empleando un cartucho Sartobran® P (Sartorius) de 0,45 µm de manera de eliminar las células productoras presentes en el sobrenadante de cultivo.

Se empleó una resina de 20 ml (o 5 ml, según correspondiere) *DEAE Sepharose Fast Flow* empaquetada en una columna XK 16/20 (1,6 x 10 cm) (GE, Healthcare).

Inicialmente se evaluaron 6 protocolos de purificación, variando distintos puntos considerados críticos. A continuación se describen brevemente las etapas realizadas: la matriz fue equilibrada con solución tampón de fosfato de sodio 10 mM (de

determinado pH). Las muestras se acondicionaron (según se considerara necesario) con solución de equilibrado en proporción 1:3 (muestra:equilibrado) y se aplicaron en la columna a un flujo tal que permitió garantizar un tiempo de residencia de 10 min, respetando la relación 1 mg de proteína por ml de resina. Se realizó un lavado con solución de equilibrado y luego la elución por salto o gradiente (según correspondiere) con solución NaCl (a una determinada concentración) en solución tampón de fosfato de sodio 20 mM (de determinado pH). Finalizada la cromatografía fue necesario realizar etapas de regeneración y conservación de la matriz.

Posteriormente, se determinó el porcentaje de recuperación alcanzado en cada protocolo y se evaluó la pureza mediante SDS-PAGE seguido de tinción por azul brillante de *Coomasie*.

Mediante la técnica de ELISA sándwich se determinó la concentración de la enzima presente en el *flowthrough* (FT), lavados y elución y a partir del método de Bradford se cuantificó el contenido total de proteínas de cada fracción.

El rendimiento o recuperación de la purificación fue calculado utilizando la ecuación 5, donde M_f representa la masa de proteína de interés recuperada en el proceso y M_i , la masa inicial presente en la muestra. Es importante aclarar que en los protocolos de *screening* iniciales sólo se evaluó la recuperación másica proteica, y hacia finales de la puesta a punto se evaluó la recuperación en función de la actividad enzimática, la cual se determina de igual manera que en la ecuación 5, pero tomando los valores de actividad enzimática total de cada muestra. Se procedió de esta manera debido a los altos costos de dicha metodología.

$$\frac{M_f}{M_i} * 100 = \text{Recuperación (\%)} \quad (5)$$

El porcentaje de pureza se determinó como el cociente entre el contenido de proteína de interés determinado por ELISA sándwich (o medición espectrofotométrica, según el estadio del protocolo de purificación) y la concentración de proteínas totales (CPT), según la ecuación 6.

$$\frac{Crh\alpha GAL}{CPT} * 100 = \text{Pureza (\%)} \quad (6)$$

La actividad enzimática específica se calculó como el cociente entre la actividad enzimática de la proteína de interés ($U.l.ml^{-1}$) y el contenido de proteína total determinado por Bradford ($mg.ml^{-1}$).

El enriquecimiento se define como el cociente entre la actividad específica de la muestra obtenida luego de un paso de purificación (AE_2) y la actividad específica inicial (AE_i), y se calculó según la ecuación 7.

$$\frac{AE_2}{AE_i} = \text{enriquecimiento} \quad (7)$$

La Tabla 14 resume los 6 protocolos de purificación, con sus respectivas modificaciones.

Tabla 14. Protocolos de purificación evaluados en una cromatografía de intercambio aniónico débil (DEAE Sepharose Fast Flow).

| Protocolo | Siembra | pH | Elución | Recuperación másica (%) |
|-----------|---|----|--------------------------------|-------------------------|
| 1 | Crudo | 7 | Salto Salino (NaCl 0,5 M) | 1,9 |
| 2 | Acondicionada en solución tampón de equilibrado | 7 | Salto Salino (NaCl 0,5 M) | 45 |
| 3 | Acondicionada en solución tampón de equilibrado | 6 | Salto Salino (NaCl 0,5 M) | 92 |
| 4* | Acondicionada en solución tampón de equilibrado | 6 | Gradiente Salino (NaCl 0,5 M) | 15 |
| 5 | Acondicionada en solución tampón de equilibrado | 6 | Gradiente Salino (NaCl 0,25 M) | 49,4 |
| 6** | Acondicionada en solución tampón de equilibrado | 6 | Gradiente Salino (NaCl 0,25 M) | 63,7 |

*Se incorporó un segundo paso de lavado (NaCl 0,1 M en fosfato de sodio 10 mM, pH 6,0). **Se trabajó a un tiempo de residencia de 5 min.

En el primer protocolo de purificación se obtuvo una recuperación de tan sólo 1,9 %, mientras que un 77% se perdió con el FT; probablemente el remanente de la proteína haya sido retenida en la matriz debido a condiciones de elución o lavado insuficientes para lograr la remoción de la misma. En el segundo protocolo de purificación se logró un porcentaje de recuperación de 45%, no observándose pérdida de la proteína en el FT ni en los lavados, por lo que probablemente el 55% restante haya quedado retenido en la columna. En el tercer protocolo, en el cual se trabajó en condiciones de pH 6, se observó una notable mejoría en el porcentaje de recuperación (92%). Durante el protocolo 4, en el que se incorporó un segundo paso de lavado con NaCl 0,1 M en fosfato de sodio 10 mM (pH 6,0), con el fin de remover un mayor

porcentaje de contaminantes, el 60% de la proteína se perdió en este paso, lo que estaría indicando que el mayor porcentaje de la proteína eluye a baja fuerza iónica. Esto condujo a realizar una quinta purificación, aplicando una elución en gradiente con solución NaCl 0,25 M en fosfato de sodio 10 mM (pH 6,0). Sin embargo, sólo se obtuvo un 60% de rendimiento total. Se creyó que una pérdida de capacidad de la columna podría traer aparejada la reducción en el porcentaje de recuperación, por lo que se realizó un tratamiento de la matriz con cloruro de guanidinio 6 M, no observándose cambios (la resina se encontraba roja por la unión inespecífica del colorante rojo fenol, presente en el medio de cultivo). Finalmente, se realizó una sexta purificación empleando una resina nueva, a la que posteriormente se le realizó un CIP (*cleaning in place*) con NaOH 1 M. Este tratamiento permite remover el colorante pero lleva a la disminución del número de ciclos de la resina. Se obtuvo un porcentaje de recuperación próximo al 60%, lo que podría deberse a la reducción en el tiempo de residencia de 10 a 5 min durante el paso de elución.

Como se mencionó, la pureza se evaluó mediante SDS-PAGE seguido de tinción por azul brillante *Coomassie*. En todos los casos, se observaron bandas similares en la muestra de partida y la elución, evidenciándose sólo una concentración de la muestra. Se logró una mejoría entre el protocolo 1 y el protocolo 3, congruente con los resultados obtenidos mediante ELISA sándwich. Durante los protocolos sucesivos (del 4 al 6) no se logró una mejoría notable en el grado de pureza, acotando este método de IEX a un paso sólo de captura y no de purificación.

Por otro lado, en lo que refiere al colorante rojo fenol, si bien realizando un paso de CIP con NaOH 1 M se pudo eliminar cierto porcentaje del mismo, su remoción completa no fue factible. Se ha reportado que dicho colorante se une fuertemente a los intercambiadores aniónicos reduciendo la capacidad de la resina. A su vez, dada su semejanza estructural al estradiol, ingresa al citoplasma celular y se comporta como un agonista de los receptores de estrógenos ejerciendo esta acción en el rango de 15 a 45 μM (que es la concentración normalmente usada en los medios de cultivo). De este modo, estimula la proliferación de ciertos tipos celulares [124, 125]. Por ese motivo, las agencias regulatorias alertan acerca de la factibilidad de su utilización.

A manera de ejemplo, se muestra el cromatograma (Figura 57) y SDS-PAGE (Figura 58) correspondientes al protocolo 3.

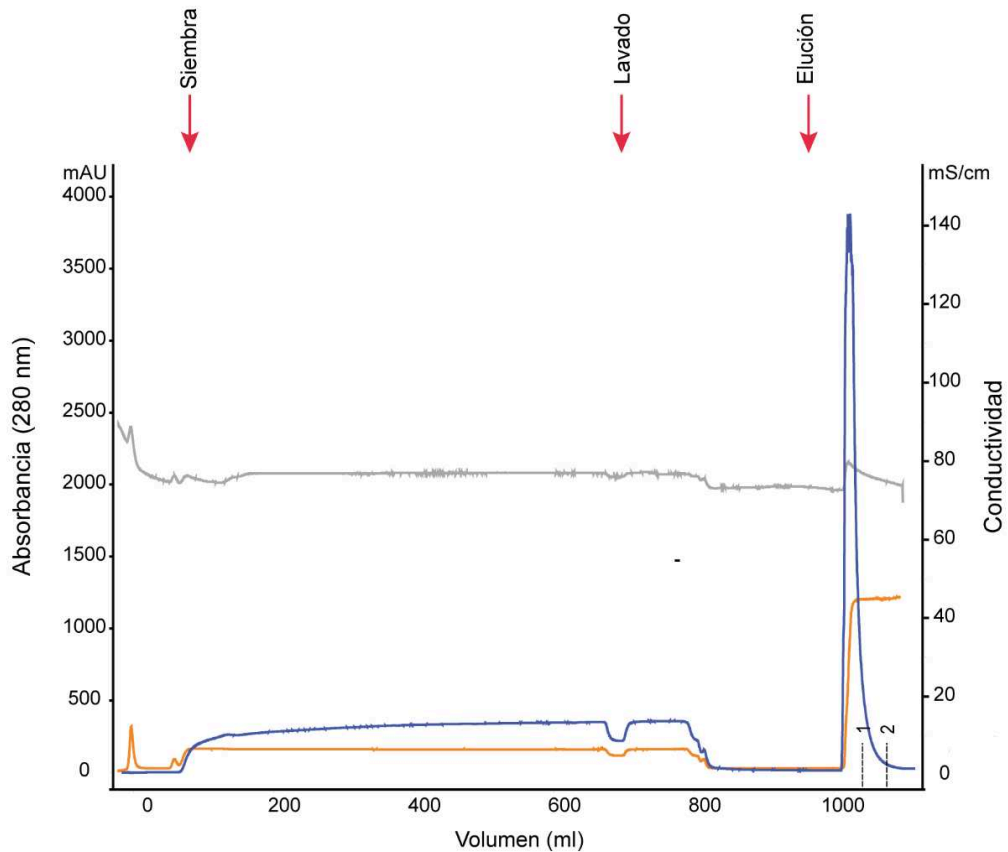


Figura 57. Purificación de rhoGAL por cromatografía IEX (DEAE Sepharose Fast Flow), de acuerdo al protocolo 3. En el cromatograma se representan las señales de absorbancia a $\lambda = 280$ nm (azul), conductividad (naranja) y pH (gris), en función del volumen de elución. Se indican, además, las etapas de siembra, lavado y elución.

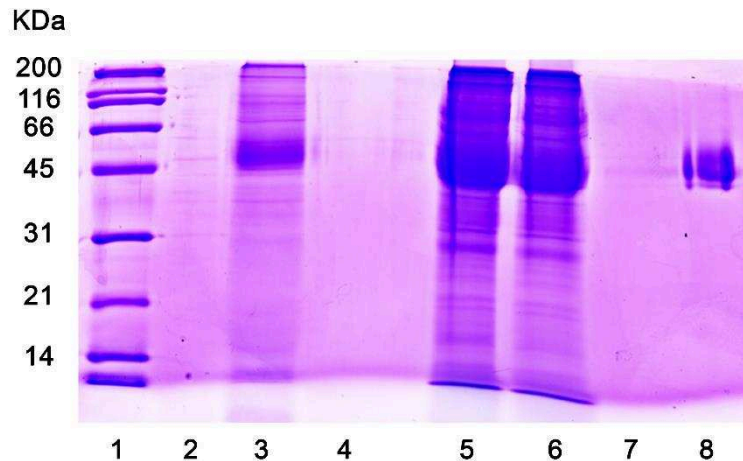


Figura 58. Evaluación de la purificación de rhoGAL por cromatografía IEX (DEAE Sepharose Fast Flow), protocolo 3. Las fracciones correspondientes a cada etapa de purificación se analizaron mediante SDS-PAGE. Calles: 1- Marcadores de masa molecular (Bio-Rad); 2- FT; 3- Siembra; 4- Lavado; 5- Elución fracción 1; 6- Elución fracción 2; 7- Regeneración; 8- Molécula de referencia, Fabrazyme®.

Por todas las razones mencionadas, se propuso cambiar de principio cromatográfico por una cromatografía de pseudo-afinidad empleando una resina Blue

Sepharose (Cibacron Blue 3G). Según experiencias previas de nuestro laboratorio, este tipo de resina no presenta problemas de pérdida de capacidad por unión inespecífica de colorantes presentes en el medio de cultivo. La adsorción de las proteínas a colorantes triazínicos es compleja. Los grupos sulfónicos introducidos a los colorantes para aumentar su solubilidad pueden comportarse como intercambiadores catiónicos. El grupo cromóforo de los mismos es generalmente aromático y/o heterocíclico, lo cual le otorga un carácter hidrofóbico. Las proteínas pueden unirse a estos grupos mediante uniones puente de hidrógeno e interacciones de Van der Waals [126].

Se empleó una resina de 20 ml (o 5 ml, según correspondiere) de pseudoafinidad a colorante empaquetada en una columna XK 16/20 (1,6 x 10 cm) (GE, Healthcare). En este caso, se utilizaron 3 protocolos, variando distintos puntos considerados críticos.

A continuación se describen brevemente las diferentes etapas: la matriz fue equilibrada con solución fosfato de sodio 20 mM (de determinado pH). Las muestras se acondicionaron (según se considerara necesario) con solución de equilibrado en una proporción 1:3 (muestra:equilibrado) y se aplicaron en la columna a un flujo tal que garantizara un tiempo de residencia de 10 min, respetando la relación 1 mg por ml de resina. Se lavó con solución de equilibrado. El modo habitual para lograr la desorción proteica es mediante aumento de la fuerza iónica, por lo que se realizó la elución por salto o gradiente salino, dependiendo del protocolo. Finalizada la cromatografía fue necesario realizar etapas de CIP y conservación de la matriz.

Luego se determinó el porcentaje de recuperación (según ecuación 5) alcanzado con cada protocolo y se evaluó la pureza mediante SDS-PAGE. La Tabla 15 resume los tres protocolos de purificación, con sus respectivas modificaciones.

Tabla 15. Protocolos de purificación evaluados en una cromatografía de pseudoafinidad a colorantes.

| Protocolo | Siembra | pH | Elución | Recuperación másica (%) |
|-----------|---|----|--|-------------------------|
| 1 | Acondicionada en solución tampón de equilibrado | 7 | Salto Salino (NaCl 0,8 M) | - |
| 2 | Acondicionada en solución tampón de equilibrado | 6 | Gradiente Salino (NaCl 1 M) | 55 |
| 3 | Acondicionada en solución tampón de equilibrado | 6 | Gradiente Salino (NaCl 1 M)+ etilenglicol 25%(v/v) | 71 |

En el primer protocolo de purificación el porcentaje de proteína recuperada fue prácticamente nulo, lo que podría atribuirse a que la fuerza iónica empleada (a ese pH) no resultó suficiente para eluir la proteína de interés. En el segundo protocolo de purificación, en el que se realizó un cambio de pH, se logró una notable mejoría. No obstante, el porcentaje de recuperación siguió siendo bajo para un primer paso de purificación, por lo que se propuso realizar un tercer protocolo, realizando una elución en una condición más drástica: gradiente salino en proporción 75:25 agua:etilenglicol. Se obtuvo la proteína activa ($11,8 \text{ UI}\cdot\text{mg}^{-1}$) con un porcentaje de recuperación másica de 71%. Sin embargo, para lograr este incremento de la recuperación fue necesario el empleo de etilenglicol, solvente que si bien es aceptado, su uso es en detrimento de las nuevas tendencias, denominada química verde, que buscan reducir el empleo de solventes [127]. Asimismo, si se considera una mayor escala de trabajo, el uso de solventes encarece el costo del proceso no sólo por el empleo del solvente en sí mismo, sino también porque probablemente se requiera realizar un acondicionamiento previo de la muestra para ingresar al segundo paso de purificación.

Todos estos resultados preliminares motivaron a realizar una nueva fermentación de la línea celular CHO_s GAL TD3 50 en medio EX-CELL® 302 en ausencia del indicador de pH, rojo fenol ($\sim 1,15 \text{ UI}\cdot\text{mg}^{-1}$ de $\rho\alpha\text{GAL}$), de manera de retomar la purificación mediante intercambio aniónico débil con *DEAE Sepharose Fast Flow*.

Sobre la base de los resultados previos, se seleccionó como condición de adsorción una solución de 10 mM de fosfato de sodio (pH 6,0) (solución de equilibrado), realizando el acondicionamiento de la muestra en línea con solución tampón de equilibrado en una proporción 1:3 (muestra:equilibrado). Para la recuperación de la proteína adsorbida, en primer lugar se propuso una elución en gradiente con solución NaCl 2 M en fosfato de sodio 10 mM (pH 6,0), trabajando a un tiempo de residencia de 10 min durante todo el proceso. Esto permitió elegir la fuerza iónica que garantizara la recuperación del contenido total de enzima.

A continuación se muestra el cromatograma obtenido durante la purificación (Figura 59), la cual fue monitoreada por espectrofotometría a $\lambda = 280 \text{ nm}$.

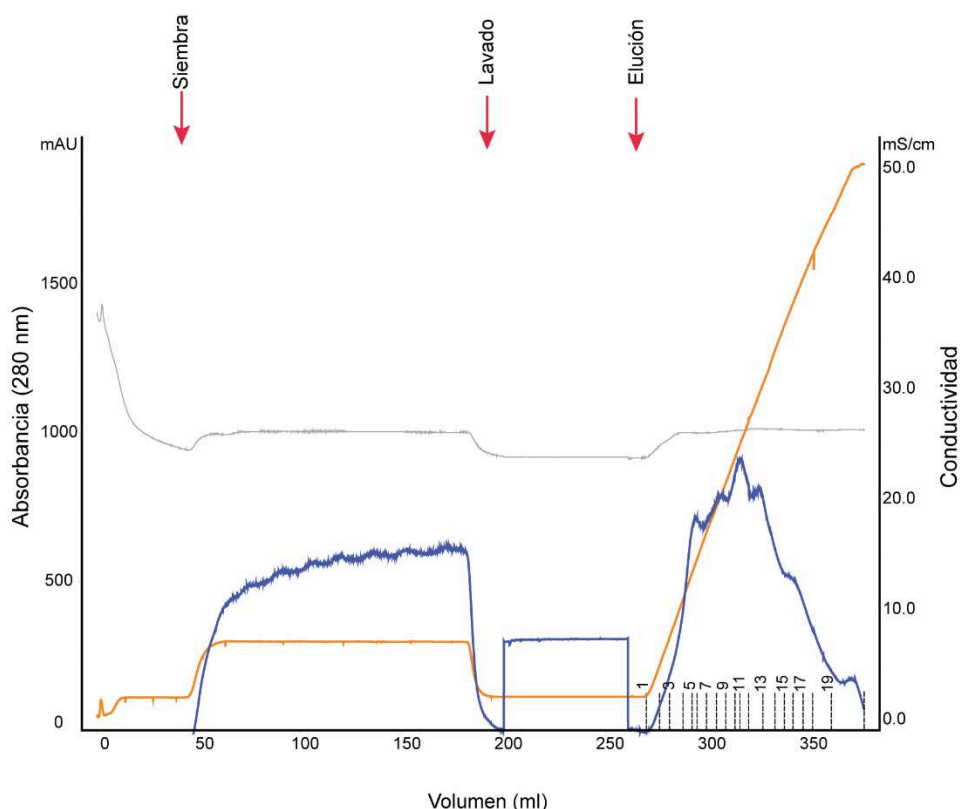


Figura 59. Purificación de rhoGAL por IEX (DEAE Sepharose Fast Flow) aplicando una elución por gradiente salino. En el cromatograma se representan las señales de absorbancia a $\lambda = 280$ nm (azul), conductividad (anaranjado) y pH (gris), en función del volumen de elución. Se indican, además, las etapas de siembra, lavado y elución. Los números indican las fracciones recolectadas para su posterior análisis.

En la Tabla 16 se muestra la recuperación másica de rhoGAL calculada en las diferentes fracciones evaluadas y en la Figura 60 se muestra un SDS-PAGE de las diferentes fracciones.

Tabla 16. Recuperación másica de rhoGAL en las diferentes fracciones de la cromatografía IEX (DEAE Sepharose Fast Flow) mediante elución en gradiente salino.

| | rhoGAL (mg.ml ⁻¹) | Volumen (ml) | R* (%) |
|--------------------|----------------------------------|-----------------|-----------|
| Siembra | 0,07 | 50 | |
| Flowthrough | 0,0004 | 150 | 1,7 |
| Lavado | 0,0003 | 25 | 0,2 |
| Eluato 2 | N/D | - | - |
| Eluato 3 | N/D | - | - |
| Eluato 4 | 0,01 | 5 | 1,7 |
| Eluato 5 | 0,1 | 5 | 19,5 |
| Eluato 6 | 0,3 | 2,5 | 23,4 |
| Eluato 7 | 0,2 | 5 | 26,2 |
| Eluato 8 | 0,05 | 5 | 7,0 |
| Eluato 9 | 0,07 | 50 | 1,2 |

*Recuperación másica (%).

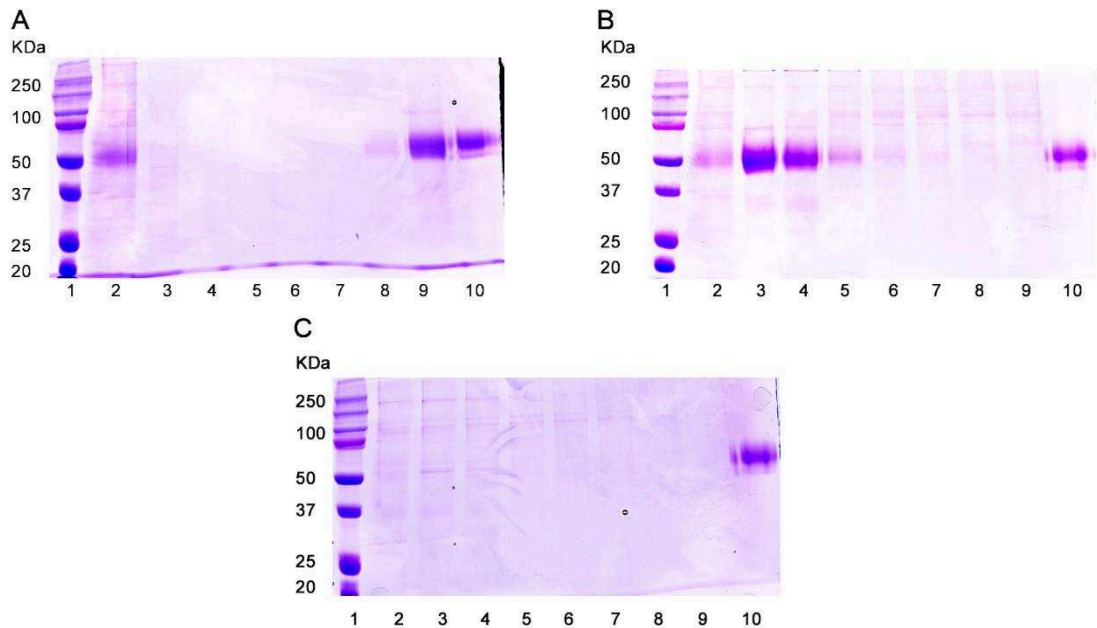


Figura 60. Evaluación de la purificación de rhaGAL por IEX (DEAE Sepharose Fast Flow) mediante elución en gradiente salino. Las fracciones correspondientes a cada etapa de purificación se analizaron mediante SDS-PAGE. Calles: 1- Marcadores de masa molecular (Bio-Rad); 2- Siembra; 3- FT; 4- Lavado; 5 a 9- Elución fracción 1 a 5, respectivamente; 10- Molécula de referencia, Fabrazyme® (**A**). Calles: 1- Marcadores de masa molecular (Bio-Rad); 2- Siembra; 3 a 9- Elución fracción 6 a 12, respectivamente; 10- Molécula de referencia, Fabrazyme® (**B**). Calles: 1- Marcadores de masa molecular (Bio-Rad); 2 a 9- Elución fracción 13 a 20, respectivamente; 10- Molécula de referencia, Fabrazyme® (**C**).

Sobre la base de los resultados de recuperación obtenidos en la purificación anterior se planteó un nuevo protocolo, realizando una elución mediante salto salino con NaCl 0,18 M en fosfato de sodio 10 mM (pH 6,0).

En la Figura 61 se muestra el cromatograma obtenido. En la Tabla 17 se resumen los parámetros recuperación másica y pureza de las diferentes fracciones y en la Figura 62 se muestra un SDS-PAGE seguido de tinción por azul brillante de *Coomasie* de las diferentes fracciones analizadas.

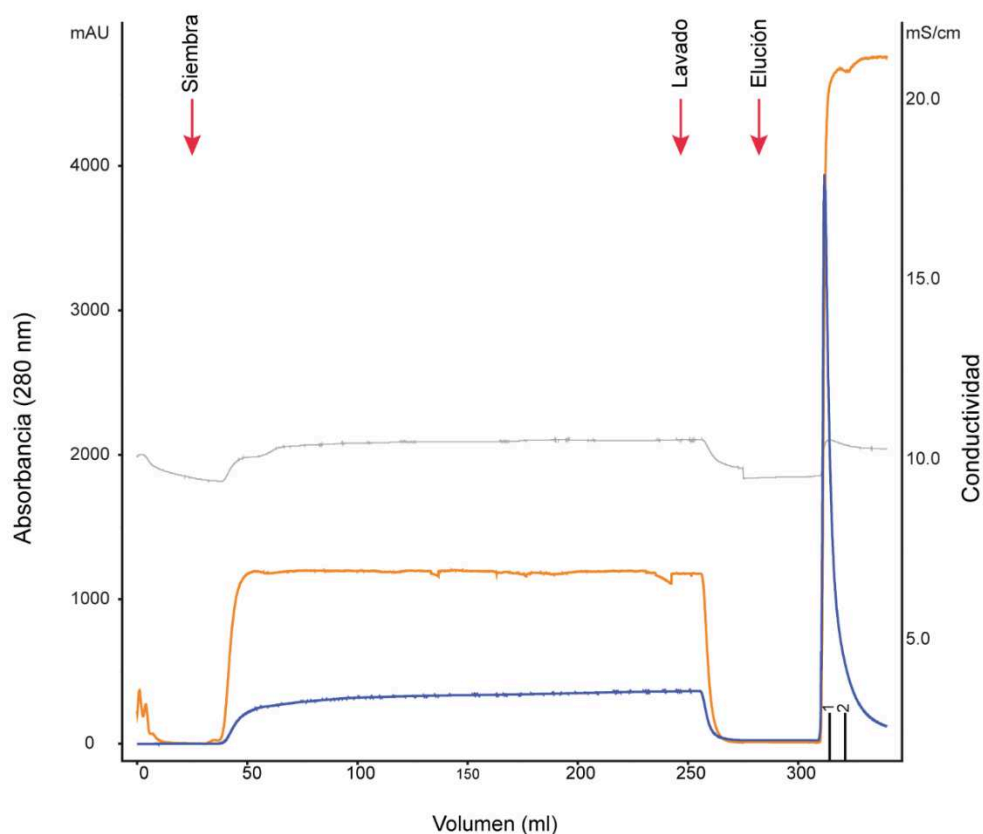


Figura 61. Purificación de $\rho\alpha$ GAL por IEX (DEAE Sepharose Fast Flow) mediante elución en salto salino. En el cromatograma se representan las señales de absorbancia a $\lambda = 280$ nm (azul), conductividad (anaranjado) y pH (gris), en función del volumen de elución. Se indican, además, las etapas de siembra, lavado y elución. Los números indican las fracciones recolectadas para su posterior análisis.

Tabla 17. Recuperación másica y pureza de $\rho\alpha$ GAL en las diferencias fracciones de la cromatografía IEX mediante elución en salto salino.

| | Volumen (ml) | Proteína total (mg.ml ⁻¹) | $\rho\alpha$ GAL (mg.ml ⁻¹) | R* (%) | Pureza (%) |
|--------------------------------------|--------------|---------------------------------------|---|--------|------------|
| Siembra | 50 | 0,25 | 0,025 | 100 | 10 |
| Flowthrough | 150 | 0,09 | N/D | | |
| Lavado | 25 | 0,07 | $3,5 \times 10^{-3}$ | | |
| Eluato IEX (fracciones 1 y 2) | 9 | 0,41 | 0,13 | 94 | 32 |

*Recuperación másica (%).

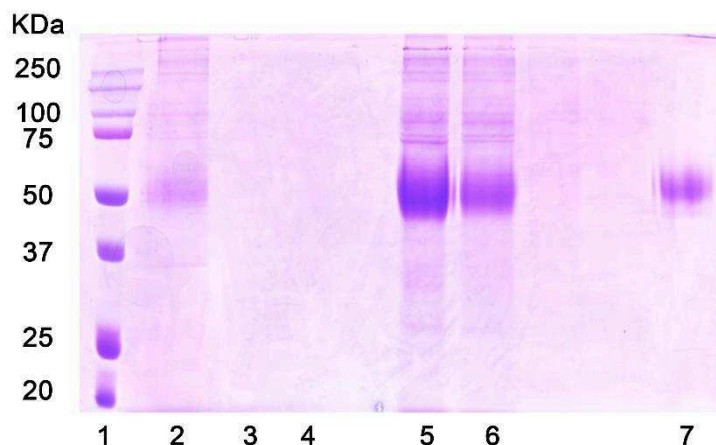


Figura 62. Evaluación de la purificación de rhoGAL por IEX (DEAE Sepharose Fast Flow) mediante elución en salto salino. Las fracciones correspondientes a cada etapa de purificación se analizaron mediante SDS-PAGE. Calles: 1- Marcadores de masa molecular (Bio-Rad); 2- Siembra; 3- FT; 4- Lavado; 5- Elución fracción 1; 6- Elución fracción 2; 7- Molécula de referencia Fabrazyme®.

Mediante este paso cromatográfico se logró obtener la proteína activa ($\sim 10 \pm 2$ UI.mg⁻¹; n=2), con una pureza del $\sim 28 \pm 6$ % (n=2) y una recuperación (másica) de $\sim 94 \pm 8$ % (n= 4). Debido a que este paso de purificación consiste en un intercambio aniónico, se pueden perder ciertas isoformas, por lo que se evaluó el perfil de isoformas cargadas del eluato en comparación con el de la siembra y el de la molécula de referencia mediante isoelectroenfoque seguido de *western blot* (Figura 63). A partir del mismo, se evidenció que no se pierde ninguna isoforma, por lo que se propuso esta cromatografía como primer paso.

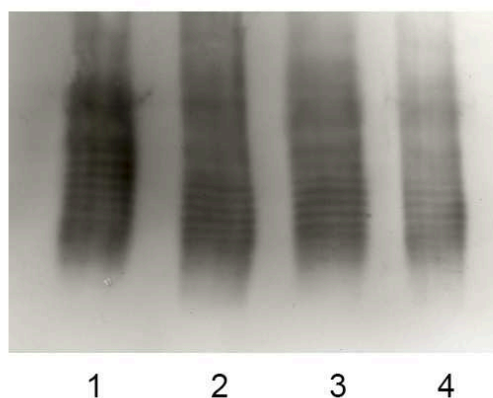


Figura 63. Análisis del patrón de isoformas luego del primer paso de purificación mediante IEX (DEAE Sepharose Fast Flow). Se comparó el patrón de isoformas tanto de la línea celular CHO GAL TD3 50 (Siembra IEX) como de los eluatos del primer paso cromatográfico entre sí y con respecto a la molécula de referencia. Calles: 1- Molécula de referencia Fabrazyme®; 2- Sobrenadante línea celular CHO GAL TD3 50; 3- Elución fracción 2 IEX; 4- Elución fracción 3 IEX.

2. Desarrollo del segundo paso de purificación de rhaGAL

Se propuso como segundo paso una cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC). Esta cromatografía se utiliza para la purificación de proteínas en un amplio rango de escalas (preparativa y analítica). Se emplea en la remoción de una gran cantidad de impurezas (más precisamente, agregados que poseen diferentes características hidrofóbicas con respecto a la molécula de interés). La interacción hidrofóbica se ve favorecida en un ambiente acuoso con alto contenido de sal. Asimismo, la interacción entre la proteína y el ligando hidrofóbico unido al adsorbente se produce como consecuencia de un aumento de la entropía total del sistema. La polaridad del solvente se puede controlar a través de la adición de sal o solventes orgánicos que pueden aumentar o disminuir la interacción hidrofóbica entre la proteína y el ligando [128].

Como se mencionó previamente, la influencia de los iones sobre la interacción hidrofóbica está explicada por la serie de Hofmeister. Las sales más comúnmente empleadas son el NaCl y el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (o Na_2SO_4). Los solventes orgánicos suelen debilitar la interacción hidrofóbica, entre los que se pueden mencionar el acetonitrilo, glicoles o alcoholes. Por lo general, se suelen adicionar durante el proceso de elución proteica.

La hidrofobicidad de la proteína es función de una gran cantidad de propiedades que incluyen la secuencia aminoacídica, así como la estructura terciaria y cuaternaria.

En lo referente a resinas, los adsorbentes empleados en HIC suelen ser una matriz de diferente tamaño (5 a 200 μm), acoplada a un ligando hidrofóbico. Los ligandos suelen ser cadenas alquil o aril. En general, la fuerza de la unión aumenta al incrementar la longitud de la cadena orgánica. Entre los ligandos más comúnmente empleados se pueden mencionar a los grupos butil, octil y fenil. Asimismo, la densidad de ligando unido (la cantidad de ligando por unidad de superficie) determina la fuerza de la interacción hidrofóbica.

Previo a la carga de la resina, se debe establecer la concentración de sal de modo tal que se garantice la unión al adsorbente, y se evite la precipitación de la proteína. El pH de la solución tampón puede influenciar dicha unión; tanto la proteína como el adsorbente deben ser estables al pH seleccionado. En general, el rango de sal utilizado es de 0,5 a 2,0 M. En la mayoría de los casos, para establecer la concentración de sal y el tipo de sal que garanticen la unión, se requiere trabajo experimental.

Por otra parte, la elución de la proteína se puede realizar de forma isocrática (salto) o mediante un gradiente, de la siguiente manera: concentración salina

decreciente, adición de solventes orgánicos (lo que genera cambios en la polaridad del solvente), incremento en la concentración de la sal caotrópica, y adición de detergente.

La elución en gradiente es un método efectivo de *screening*. En general, se suele seleccionar como primer método de elución la reducción en la concentración de sal. En el caso de que la proteína de interés permanezca unida al adsorbente, se deberá emplear una sal más débil o bien seleccionar una condición de elución más drástica. Una vez definido el proceso de elución se determina una condición de elución isocrática ya que ésta resulta más simple [128].

Sobre la base de lo descrito, para el desarrollo del segundo paso de purificación se evaluaron diferentes resinas con características hidrofóbicas, sales de diferente tipo y concentración y diferentes pH.

Para todos los casos se realizaron dos protocolos, variando el tipo y concentración de sal. En el protocolo 1 se trabajó con Na_2SO_4 mientras que en protocolo 2 con NaCl . De esta manera, 3 ml de resina empaquetada en una columna XK 16/20 (1,6 x 10 cm) (GE, Healthcare), fue equilibrada con 10 volúmenes de columna de solución de equilibrado (Na_2SO_4 1 M o NaCl 2 M en fosfato de sodio 10 mM, pH 6,0). Las fracciones del eluato obtenido luego del primer paso de purificación se ajustaron a una condición de Na_2SO_4 1,0 M o NaCl 2 M en solución tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 6,0), mediante el agregado de Na_2SO_4 1,5 M o NaCl 6 M, respectivamente. El agregado de dicha solución se realizó de manera lenta de forma de prevenir un posible efecto *salting out*. Luego de la siembra, la matriz se lavó con 5 volúmenes de columna de la solución de equilibrado. Se realizó una elución por gradiente salino descendente desde Na_2SO_4 1 M o NaCl 2 M en solución tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 6,0) hasta solución fosfato de sodio 10 mM (pH 6,0). Se trabajó a un flujo tal que se garantizara un tiempo de residencia de 10 min.

En primer lugar, se empleó una resina *Butyl Sepharose 4 Fast Flow* de 3 ml empaquetada en una columna XK 16/20 (1,6 x 10 cm) (GE, Healthcare) (densidad de ligando.ml de medio⁻¹: 40 μmol). En la Figura 64 A y B se muestra el perfil obtenido a partir de los protocolos 1 y 2, respectivamente. Luego, se determinó la pureza (%) y la recuperación másica (%) de cada procedimiento. En la Tabla 18 se resumen los parámetros recuperación y pureza y en las Figuras 65 y 66 se muestran los resultados del PAGE-SDS luego de cada protocolo.

Tabla 18. Recuperación másica y pureza de rhoGAL de la purificación por HIC utilizando una resina *Butyl Sepharose 4 Fast Flow*.

| Resina | Densidad ligando.ml ⁻¹ medio | Tipo de sal | Elución | Pureza (%) | R* % |
|--|---|---------------------------------|---|------------|------|
| <i>Butyl-Sepharose 4 Fast Flow</i> – 3 ml (columna XK 16/20) | 40 µmol | Na ₂ SO ₄ | Gradiente salino: Na ₂ SO ₄ 1 M solución fosfato de sodio 10 mM (pH 6,0) hasta fosfato 10 mM (pH 6,0) | 70 | 18,3 |
| | | NaCl | Gradiente salino: NaCl 2 M solución fosfato de sodio 10 mM (pH 6,0) hasta fosfato 20 mM (pH 6,0) | 113 | 62,9 |

*Recuperación másica (%).

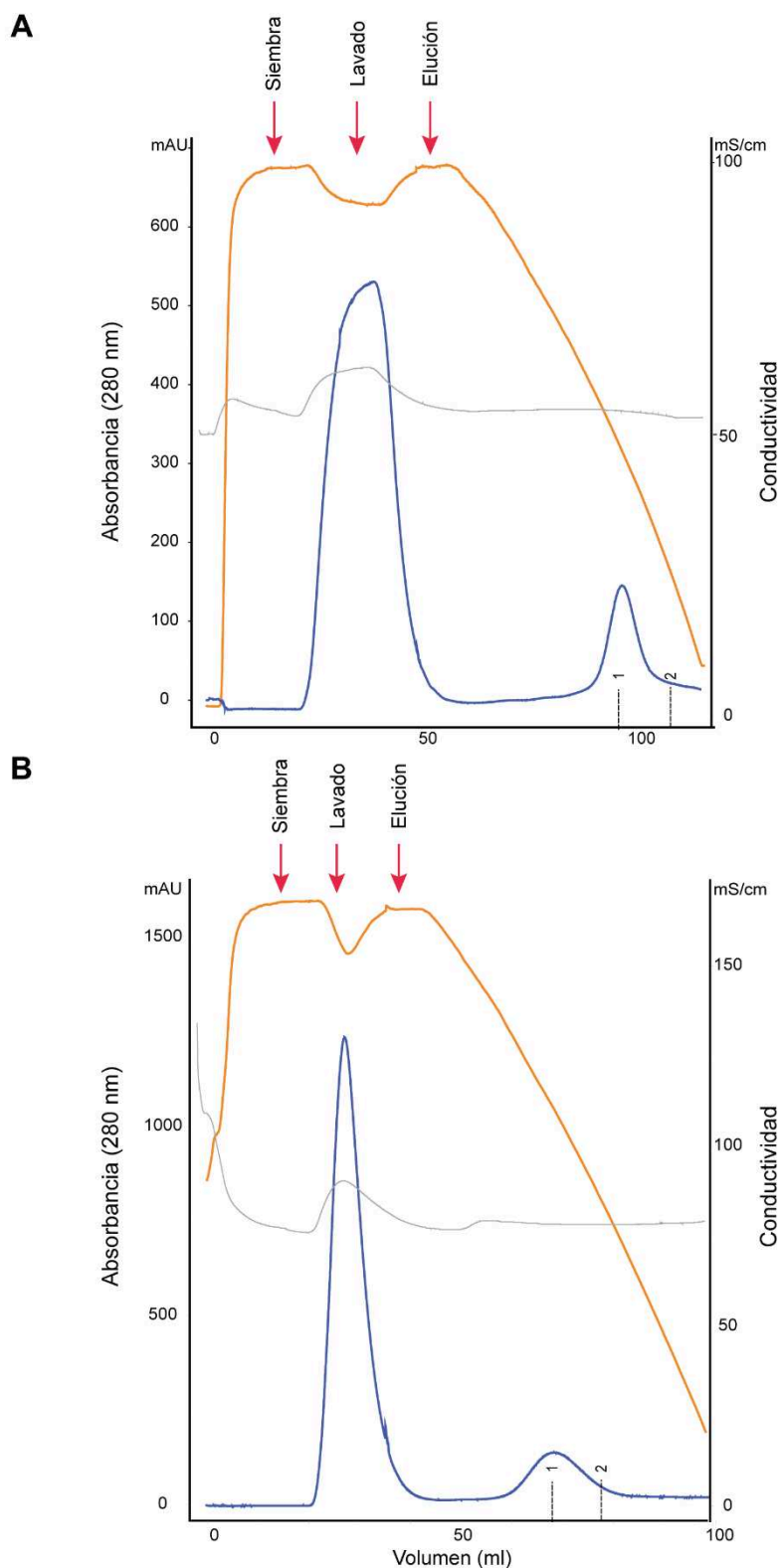


Figura 64. Purificación de rhoGAL por HIC (*Butyl Sepharose 4 Fast Flow*). Protocolo 1 (**A**). Protocolo 2 (**B**). En ambos cromatogramas se representan las señales de absorbancia a $\lambda = 280$ nm (azul), conductividad (anaranjado) y pH (gris) en función del volumen de elución. Se indican, además, las etapas de siembra, lavado y elución. Los números indican las fracciones recolectadas para su posterior análisis.

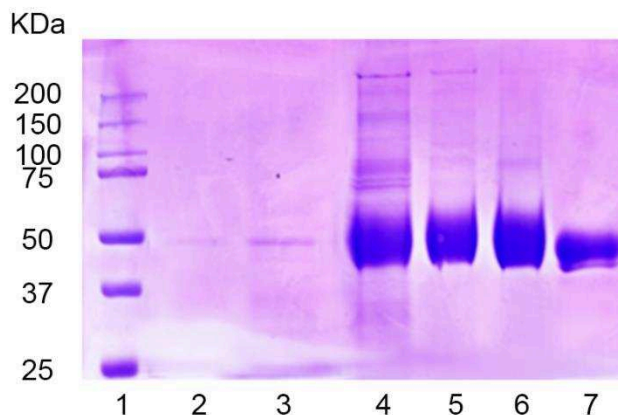


Figura 65. Evaluación de la purificación de rhoGAL por HIC (*Butyl Sepharose 4 Fast Flow*), protocolo 1. Las fracciones correspondientes a cada etapa de purificación se analizaron mediante SDS-PAGE. Calles: 1- Marcadores de masa molecular (Bio-Rad); 2- FT; 3- Lavado; 4- Siembra ; 5- Elución fracción 1; 6- Elución fracción 2; 7- Molécula de referencia Fabrazyme®.

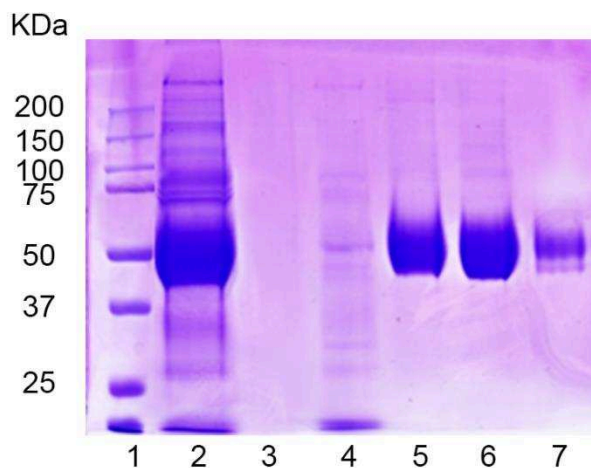


Figura 66. Evaluación de la purificación de rhoGAL por HIC (*Butyl Sepharose 4 Fast Flow*), protocolo 2. Las fracciones correspondientes a cada etapa de purificación se analizaron mediante SDS-PAGE. Calles: 1- Marcadores de masa molecular (Bio-Rad); 2- Siembra; 3- FT; 4- Lavado; 5- Elución fracción 1; 6- Elución fracción 2; 7- Molécula de referencia, Fabrazyme®.

En segundo lugar, se empleó una resina *Capto Butyl* de 3 ml empaquetada en una columna XK 16/20 (1,6 x 10 cm) (GE, Healthcare) (densidad de ligando.ml de medio⁻¹: 53 μ mol). En la Figura 67 A y B se muestra el perfil obtenido a partir de los protocolos 1 y 2, respectivamente. De igual manera que en el caso anterior, se determinó la pureza (%) y la recuperación másica (%) de cada procedimiento. En la Tabla 19 se resumen los parámetros pureza y recuperación másica y en las Figuras 68 y 69 se muestran los resultados del PAGE-SDS con las diferentes fracciones obtenidas luego de cada protocolo.

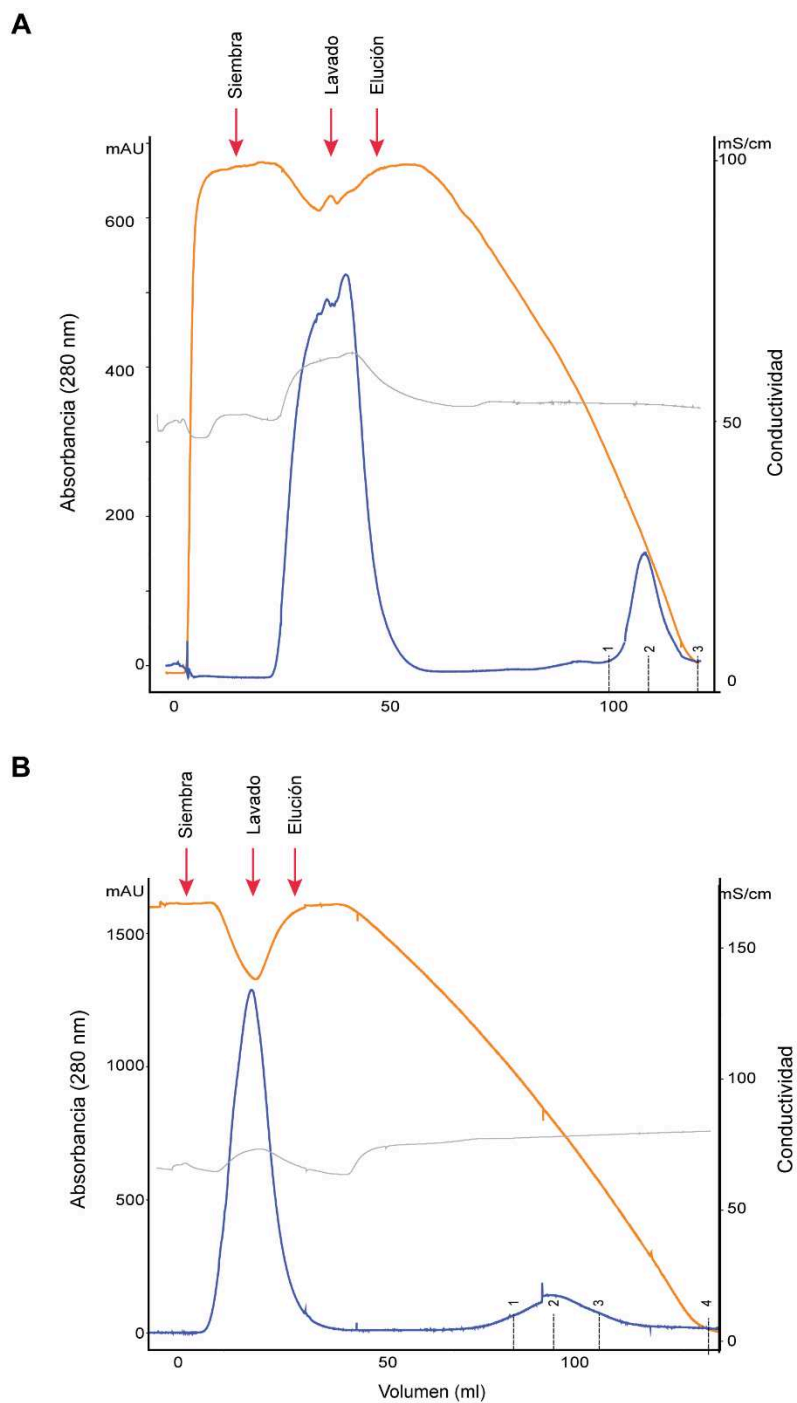


Figura 67. Purificación de rhoGAL por HIC (*Capto Butyl*). Protocolo 1 (A). Protocolo 2 (B). En ambos cromatogramas se representan las señales de absorbancia a $\lambda=280$ nm (azul), conductividad (anaranjado) y pH (gris) en función del volumen de elución. Se indican, además, las etapas de siembra, lavado y elución. Los números indican las fracciones recolectadas para su posterior análisis.

Tabla 19. Recuperación másica y pureza de rhoGAL de la purificación por HIC utilizando una resina *Capto Butyl*.

| Resina | Densidad ligando.ml ⁻¹ medio | Tipo de sal | Elución | Pureza (%) | R* % |
|--|---|---------------------------------|--|------------|------|
| <i>Capto Butyl</i> 3 ml (columna XK 16/20) | 53 µmol | Na ₂ SO ₄ | Gradiente salino: Na ₂ SO ₄ 1 M solución fosfato de sodio 10 mM (pH 6,0) hasta fosfato 10mM (pH 6,0) | 70 | 43,4 |
| | | NaCl | Gradiente salino: NaCl 2 M solución fosfato de sodio 10 mM (pH 6,0) hasta fosfato 10mM (pH 6,0) | 113 | 37,5 |

*Recuperación másica (%).

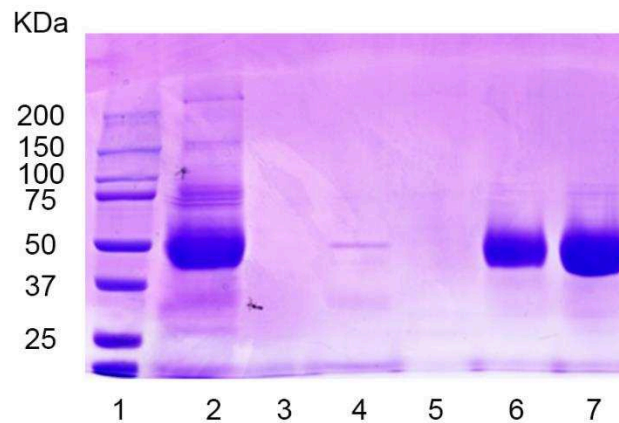


Figura 68. Evaluación de la purificación de rhoGAL por HIC (*Capto Butyl*), protocolo 1. Las fracciones correspondientes a cada etapa de purificación se analizaron mediante SDS-PAGE. Calles: 1- Marcadores de masa molecular (Bio-Rad); 2- Siembra; 3- FT; 4- Lavado; 5- Elución fracción 1; 6- Elución fracción 2; 7- Elución fracción 3.

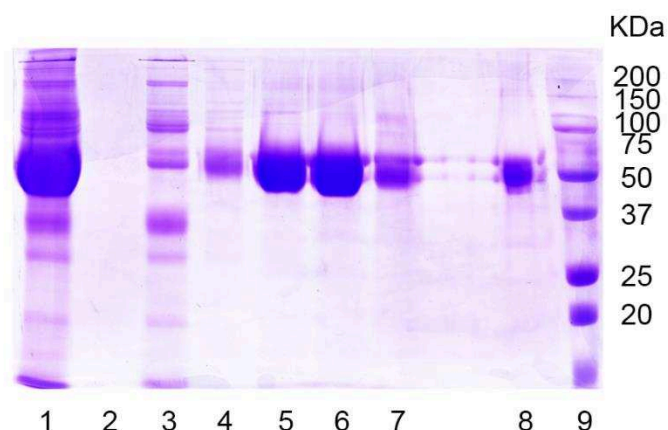


Figura 69. Evaluación de la purificación de rhαGAL por HIC (*Capto Butyl*), protocolo 2. Las fracciones correspondientes a cada etapa de purificación se analizaron mediante SDS-PAGE. Calles 1- Siembra; 2- FT; 3- Lavado; 4- Elución fracción 1; 5- Elución fracción 2; 6- Elución fracción 3; 7- Elución fracción 4; 8- Molécula de referencia Fabrazyme®; 9- Marcadores de masa molecular (Bio-Rad).

Luego de analizar los cuatro procesos cromatográficos, se determinó que tanto en el protocolo 1 como en el 2, con ambos tipos de resina, no se perdió la proteína de interés durante la adsorción ni el lavado, por lo que la condición de captura o adsorción fue adecuada.

Por otro lado, independientemente de la resina empleada, se logró eliminar un mayor porcentaje de proteínas contaminantes (aquellas que presentan un bajo porcentaje de hidrofobicidad), al trabajar con NaCl (protocolo 2). A su vez, en el caso de este último protocolo, se logró un mayor porcentaje de recuperación al emplear la resina *Butyl Sepharose 4 Fast Flow* que con la resina *Capto butyl*, lo que podría deberse a que esta última presenta una mayor densidad de ligando (recuperación de 62% y 43,4%, respectivamente).

Sobre la base de los resultados anteriores, se realizó un nuevo gradiente salino empleando NaCl y *Butyl Sepharose 4 Fast Flow*, ya que a partir de estas condiciones se lograron los mejores porcentajes de recuperación y de pureza. Las condiciones de equilibrado, siembra y lavado fueron idénticas a las aplicadas con el protocolo 2, incorporando un segundo lavado empleando una solución NaCl 2 M en fosfato de sodio 10 mM (pH 7,5). El gradiente salino aplicado durante la elución se realizó desde una solución de NaCl 2 M en fosfato de sodio 10 mM (pH 6,0) hasta solución de fosfato de sodio 10 mM (pH 7,5). En la Figura 70 se muestra el perfil cromatográfico obtenido. En las Figuras 71 y 72 se muestra el SDS-PAGE realizado con las diferentes fracciones analizadas.

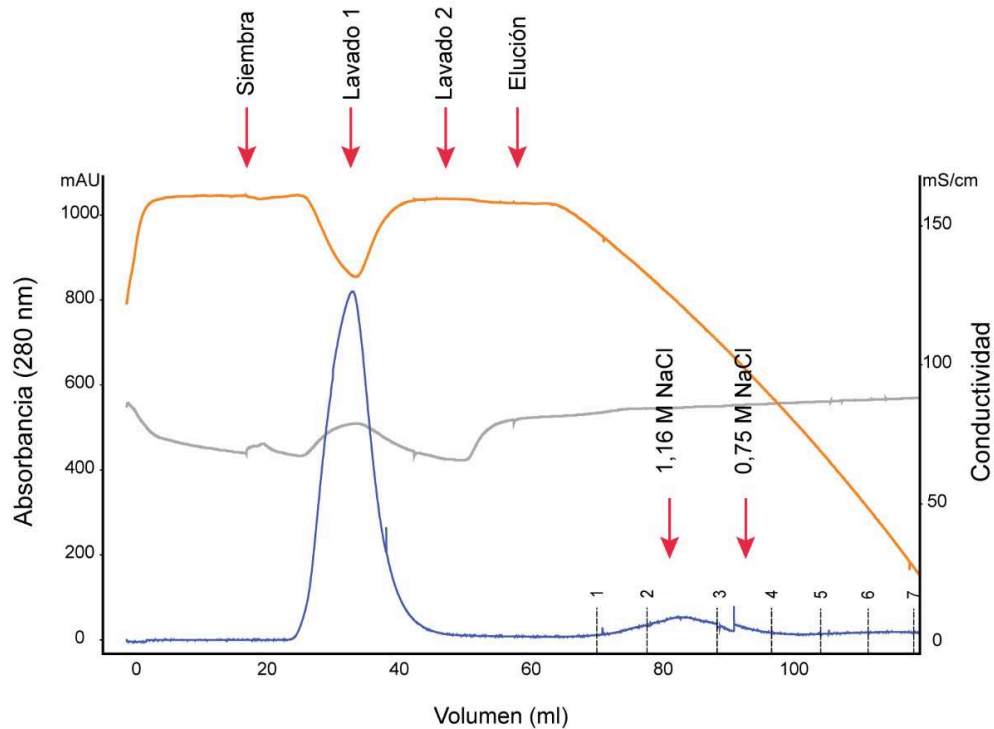


Figura 70. Purificación de rhoGAL por HIC (*Butyl Sepharose 4 Fast Flow*) mediante elución en gradiente salino. En el cromatograma se representan las señales de absorbancia a $\lambda=280$ nm (azul), conductividad (anaranjado) y pH (gris), en función del volumen de elución. Se indican, además, las etapas de siembra, lavado y elución. Los números indican las fracciones recolectadas para su posterior análisis.

Se obtuvo una recuperación total del 65%. La fracción 3 (NaCl 1,16 M) eluyó con un menor contenido de impurezas y representó un 53% de la proteína de interés. A partir de la fracción 4, el número de impurezas que co-eluyeron con la proteína de interés aumentó.

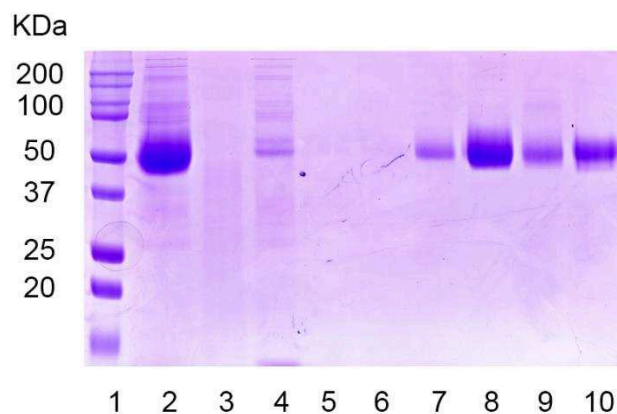


Figura 71. Evaluación de la purificación de rhoGAL por HIC (*Butyl Sepharose 4 Fast Flow*) mediante elución en gradiente salino. Las fracciones correspondientes a cada etapa de purificación se analizaron mediante SDS-PAGE. Calles: 1- Marcadores de masa molecular (Bio-Rad); 2- Siembra; 3- FT; 4- Lavado 1; 5- Lavado 2; 6- Elución fracción 1; 7- Elución fracción 2; 8- Elución fracción 3; 9- Elución fracción 4; 10- Molécula de referencia, Fabrazyme®.

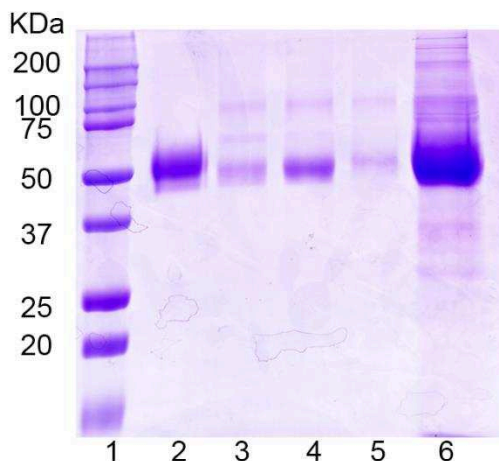


Figura 72. Evaluación de la purificación de rhoGAL por HIC (*Butyl Sepharose 4 Fast Flow*) mediante elución en gradiente salino. Las fracciones correspondientes a cada etapa de purificación se analizaron mediante SDS-PAGE. Calles: 1- Marcadores de masa molecular (Bio-Rad); 2- Molécula de referencia, Fabrazyme®; 3- Elución fracción 5; 4- Elución fracción 6; 5- Elución fracción 7; 6- Siembra.

De esta manera, considerando los resultados de la experiencia anterior, se definió la condición de elución por salto salino de la proteína de interés, empleando una solución de NaCl 0,75 M en tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 7,5). Se debe mencionar que no se seleccionó la condición con NaCl 1,16 M en solución fosfato de sodio (pH 7,5) ya que se buscó una mayor recuperación de esta etapa cromatográfica, tratando de mantener a su vez, un grado de pureza elevada. En la Figura 73 se observa el perfil cromatográfico obtenido. Los parámetros de purificación (recuperación y pureza) se muestran en la Tabla 20 y en la Figura 74, el PAGE-SDS realizado con las diferentes fracciones obtenidas.

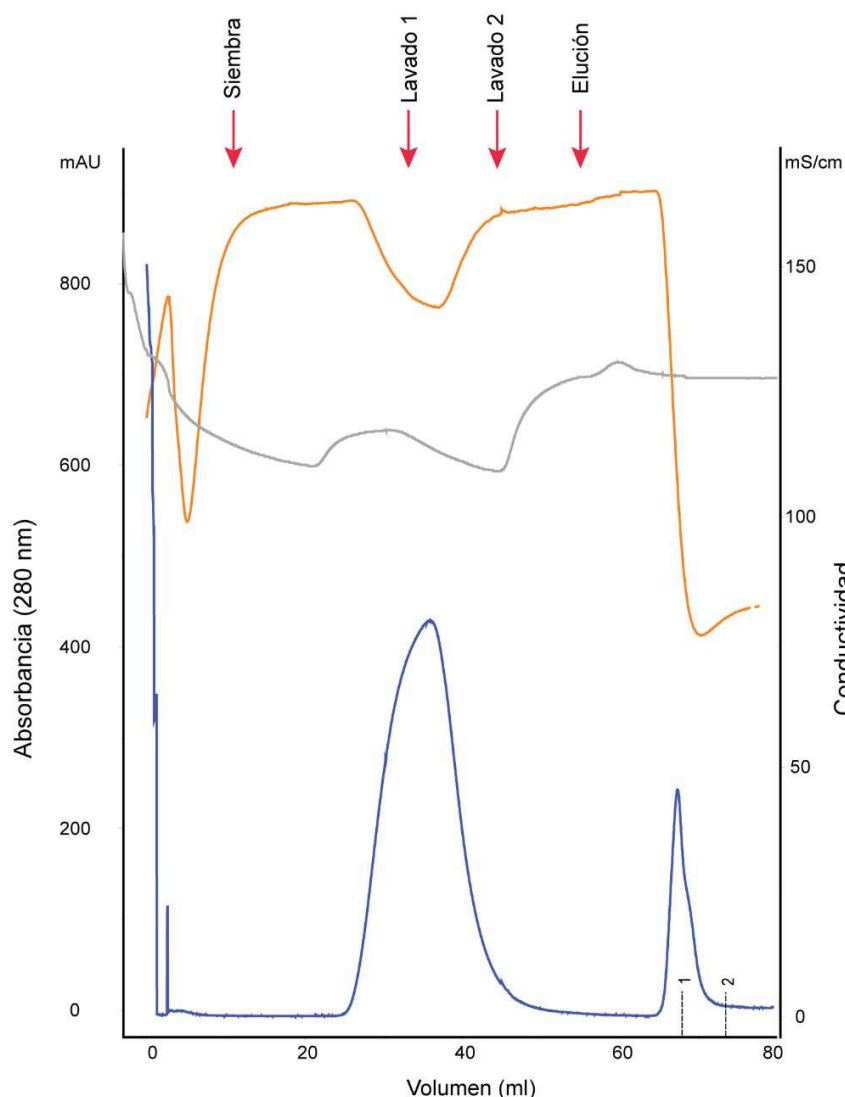


Figura 73. Purificación de rhoGAL por HIC (*Butyl Sepharose 4 Fast Flow*) mediante elución en salto salino. En el cromatograma se representan las señales de absorbancia a $\lambda = 280$ nm (azul), conductividad (anaranjado) y pH (gris), en función del volumen de elución. Se indican, además, las etapas de siembra, lavado y elución. Los números indican las fracciones recolectadas para su posterior análisis.

Tabla 20. Recuperación másica y pureza de rhoGAL de la purificación por HIC utilizando una resina *Butyl Sepharose 4 Fast Flow*. Elución en salto salino.

| | Volumen (ml) | Proteínas totales (mg.ml ⁻¹) | rhoGAL (mg.ml ⁻¹) | R* (%) | Pureza (%) |
|--------------------|-------------------|--|-------------------------------|--------|------------|
| Eluato IEX | 7 | 0,41 | 0,13 | | 32 |
| Flowthrough | 2,7 [#] | 0,17 | N/D | | |
| Lavado 1 | 3,75 [#] | 0,18 | $3,5 \times 10^{-4}$ | 0,14 | |
| Lavado 2 | 3,75 [#] | 0,016 | $3,0 \times 10^{-4}$ | 0,10 | |
| Fracción 1 | 0,75 [#] | 0,2 | 0,16 | 13 | 80 |
| Fracción 2 | 1,5 [#] | 0,7 | 0,75 | 124 | 107 |

*Recuperación másica (%).

[#]Concentrado 4 veces (4X).

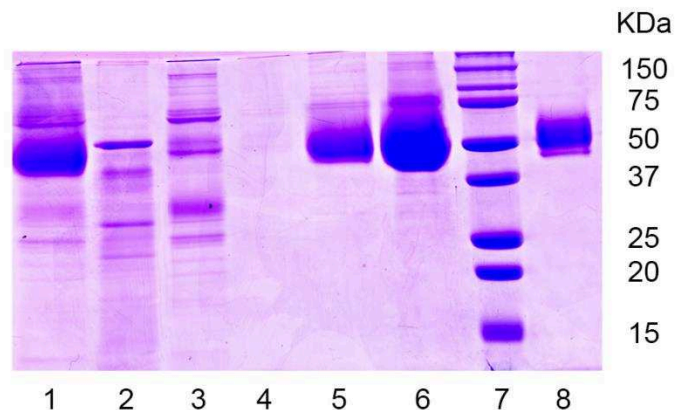


Figura 74. Evaluación de la purificación de rhoGAL por HIC (*Butyl Sepharose 4 Fast Flow*) mediante elución en salto. Las fracciones correspondientes a cada etapa de purificación se analizaron mediante SDS-PAGE. Calles 1- Siembra; 2- FT; 3- Lavado 1; 4- Lavado 2; 5- Elución fracción 1; 6- Elución fracción 2; 7- Marcadores de masa molecular (Bio-Rad); 8- Molécula de referencia Fabrazyme®.

Finalmente, se determinó la actividad enzimática *in vitro* de manera de descartar cualquier posibilidad de pérdida de funcionalidad durante el segundo paso de purificación. El eluato demostró una actividad enzimática específica de $38 \pm 4 \text{ UI} \cdot \text{mg}^{-1}$ ($n=3$).

3. Purificación de rhoGAL utilizando las 2 etapas previamente descritas

Una vez definido el proceso de purificación, que consistió en un primer paso empleando una resina de intercambio aniónico débil (*DEAE Sepharose Fast Flow*) y un segundo paso por interacción hidrofóbica (*Butyl Sepharose 4 Fast Flow*), la enzima se purificó a partir de la cosecha perteneciente a la línea celular CHO_s GAL TD3 50, la cual se identificará como "rhoGAL-L", y a partir de un clon derivado de ésta (P3G2), que se nombrará "rhoGAL-C". En las Figuras 75 a 78 se presentan los cromatogramas correspondientes a la purificación de ambas moléculas.

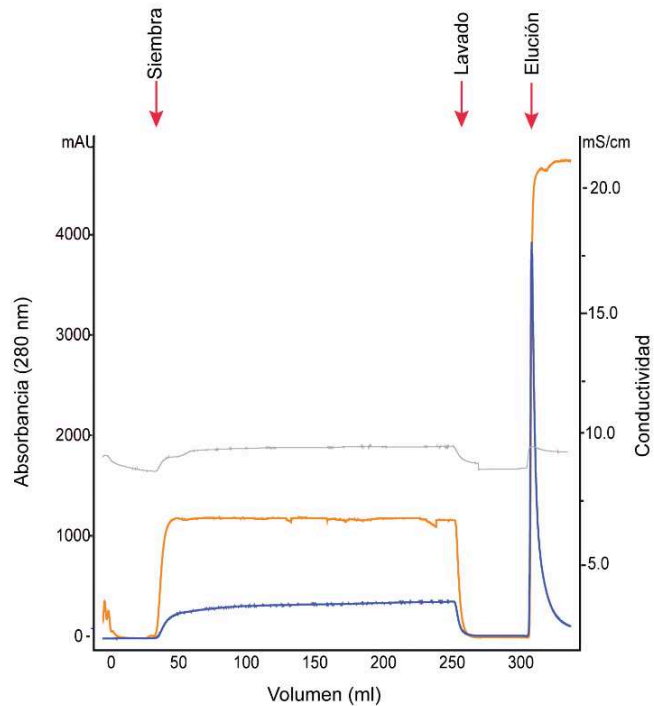


Figura 75. Purificación de rhoGAL-L mediante cromatografía de intercambio aniónico. Se utilizó una resina de 5 ml. En el cromatograma se muestran los registros de absorbancia a $\lambda = 280$ nm (azul), conductividad (anaranjado) y pH (gris), en función del volumen de elución. Las flechas indican el comienzo de cada etapa.

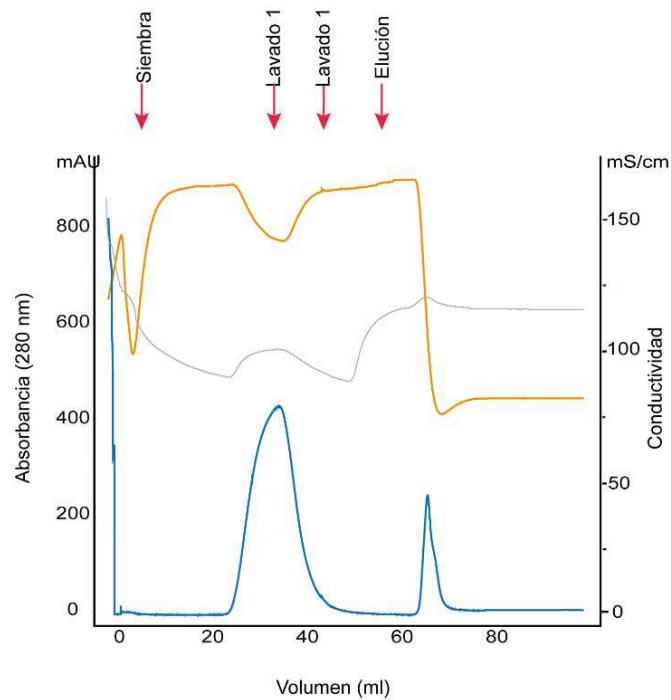


Figura 76. Purificación de rhoGAL-L mediante cromatografía hidrofóbica. Se utilizó una resina de 3 ml. En el cromatograma se muestran los registros de absorbancia a $\lambda = 280$ nm (azul), conductividad (anaranjado) y pH (gris), en función del volumen de elución. Las flechas indican el comienzo de cada etapa.

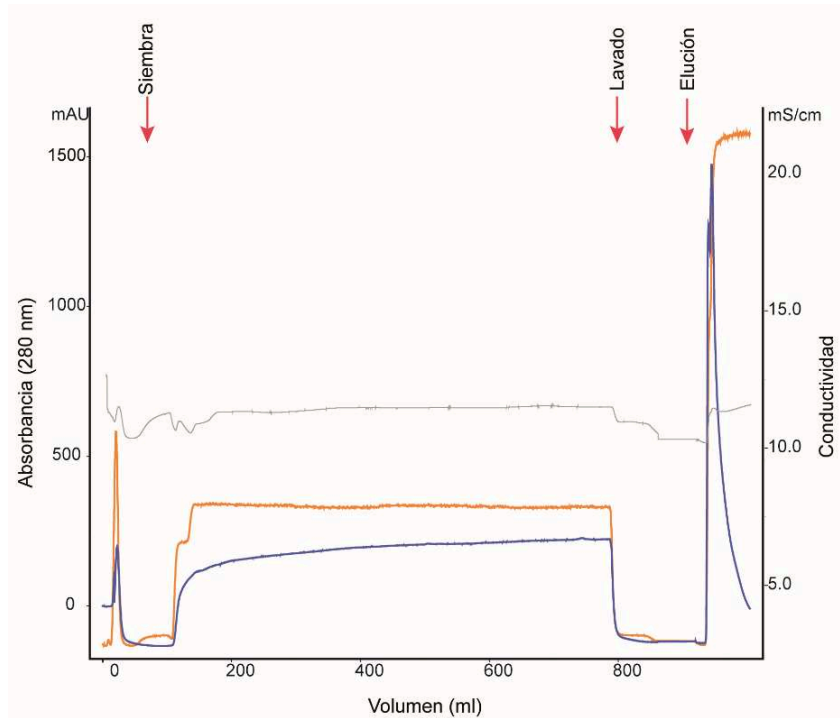


Figura 77. Purificación de rhoGAL-C mediante cromatografía de intercambio aniónico. Se emplearon 20 ml de resina. En el cromatograma se muestran los registros de absorbancia a $\lambda=280$ nm (azul), conductividad (anaranjado) y pH (gris), en función del volumen de elución. Las flechas indican el comienzo de cada etapa.

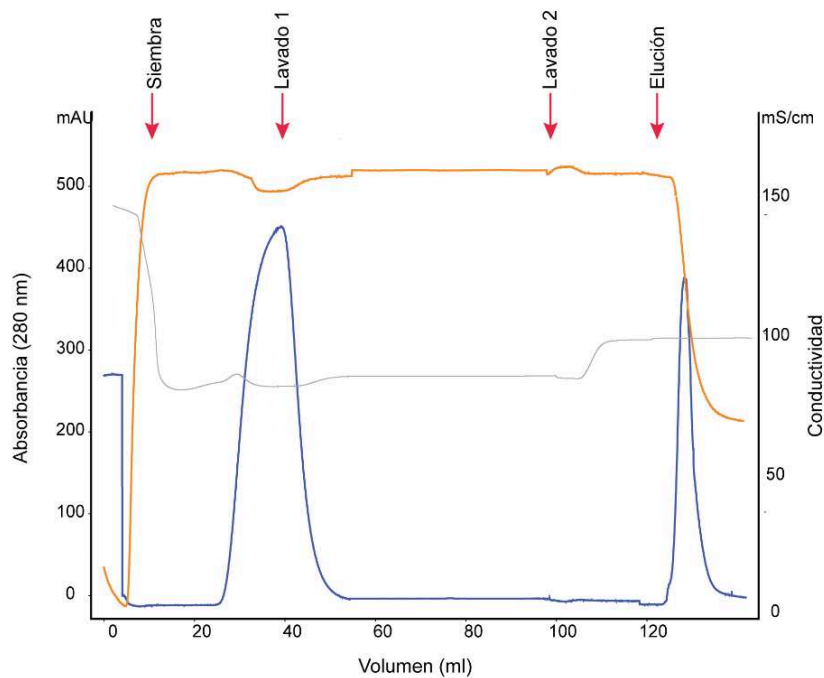


Figura 78. Purificación de rhoGAL-C mediante cromatografía hidrofóbica. Se usaron 5 ml de resina. En el cromatograma se muestran los registros de absorbancia a $\lambda=280$ nm (azul), conductividad (anaranjado) y pH (gris), en función del volumen de elución. Las flechas indican el comienzo de cada etapa.

Luego del segundo paso de purificación de ambas moléculas, se alcanzó una recuperación global del 60%. Se obtuvo una pureza del 100% (Tablas 21 y 22), considerando la concentración de rhaGAL y el contenido de proteína total determinados por ELISA y ensayo de Bradford, respectivamente. Este valor de pureza aparente del 100% se puede explicar como resultado de los errores de ambos métodos. Asimismo, se evaluó la pureza de rhaGAL mediante SDS-PAGE y se comparó con Fabrazyme®, obteniendo casi el 98% de pureza para ambas moléculas (Figuras 79 y 80).

Tabla 21. Parámetros cromatográficos calculados a partir de la purificación de rhaGAL-L.

| | V* (ml) | Actividad (UI.ml ⁻¹) | Proteína Total (mg.ml ⁻¹) | AE** (UI.mg ⁻¹) | R# (%) | Enriquecimiento | Pureza (%) |
|-----------------------|------------|-------------------------------------|---|--------------------------------|-----------|-----------------|---------------|
| Cosecha | 75,0 | 0,72 | 1,1 | 0,65 | 100 | 1 | 2,0 |
| IEX eluato | 9,0 | 7,0 | 0,8 | 8,8 | 117 | 13,5 | 23,1 |
| HIC eluato | 1,0 | 31,7 | 0,8 | 40,0 | 59 | 61,5 | 102,5 |

Todos los pasos de purificación se realizaron a 4°C. Las proteínas totales se determinaron empleando el ensayo de Bradford modificado. La recuperación se calculó a partir de la actividad enzimática total; el parámetro enriquecimiento constituye la relación entre los valores de actividad específica; la pureza se determinó como una relación entre la concentración de enzima, determinada mediante ELISA sándwich, y concentración de proteínas totales. Los parámetros recuperación y enriquecimiento constituyen valores globales.

*V= Volumen; **AE= Actividad específica; #R= Recuperación.

Tabla 22. Parámetros cromatográficos calculados a partir de la purificación de rhaGAL-C.

| | V* (ml) | Actividad (UI.ml ⁻¹) | Proteína Total (mg.ml ⁻¹) | AE** (UI.mg ⁻¹) | R# (%) | Enriquecimiento | Pureza (%) |
|-----------------------|------------|-------------------------------------|---|--------------------------------|-----------|-----------------|---------------|
| Cosecha | 250 | 0,44 | 0,22 | 2 | 100 | 1 | 16,0 |
| IEX eluato | 15 | 6,4 | 0,64 | 10,0 | 87,3 | 5 | 86,1 |
| HIC eluato | 0,4 | 168,2 | 1,33 | 126,0 | 61,1 | 63 | 127 |

Todos los pasos de purificación se realizaron a 4°C. Las proteínas totales se determinaron empleando el ensayo de Bradford modificado. La recuperación se calculó a partir de la actividad enzimática total; el parámetro enriquecimiento constituye la relación entre los valores de actividad específica; la pureza se determinó como una relación entre la concentración de enzima, determinada mediante ELISA sándwich, y concentración de proteínas totales. Los parámetros recuperación y enriquecimiento constituyen valores globales.

*V= Volumen; **AE= Actividad específica; #R= Recuperación.

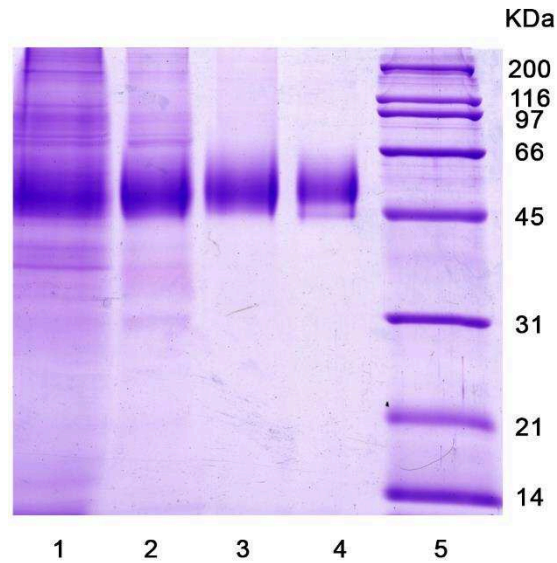


Figura 79. SDS-PAGE de las fracciones correspondientes a los diferentes estadios del protocolo de purificación rhoGAL-L. Calles: 1- Crudo clarificado; 2- Eluato primer paso purificación; 3- Eluato segundo paso purificación; 4- Fabrazyme®; 5- Marcadores de masa molecular (Bio-Rad).

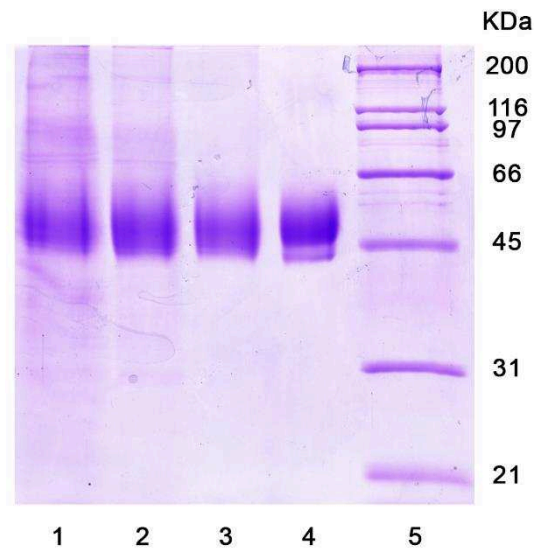


Figura 80. SDS-PAGE de las fracciones correspondientes a los diferentes estadios del protocolo de purificación de la molécula rhoGAL-C. Calles: 1- Crudo clarificado; 2- Eluato primer paso purificación; 3- Eluato segundo paso purificación; 4- Fabrazyme®; 5- Marcadores de masa molecular (Bio-Rad).

En paralelo, se realizó un ensayo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa empleando una columna C4, con el fin de analizar ambas moléculas purificadas, junto con la molécula de referencia Fabrazyme®. Al igual que lo reportado por Lee y col. (2003) [82], se lograron identificar tres picos distintos (Figura 81). Con el fin de determinar las identidades de los tres picos, Lee y col. (2003)

realizaron un análisis de la proteína, previamente digerida con tripsina, mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa (LC/MS). El pico 1 en el cromatograma constituye la enzima que carece de dos residuos de Leu C-terminal, el pico 2 comprende la proteína que carece de una única Leu C-terminal y el pico 3 corresponde a la proteína completa. En nuestro caso, las cantidades relativas de estas formas difieren en las tres preparaciones: en la molécula de referencia, Fabrazyme®, la especie predominante es la forma completa de la proteína (67,7%); en la molécula rhαGAL-L, la forma predominante es aquella que carece de un aminoácido Leu C-terminal (63,3%), mientras que en la molécula rhαGAL-C sólo se evidencian dos especies, siendo también la especie predominante aquella que no posee una Leu terminal (92,1%). Mediante este ensayo, se puede concluir que no se identificaron impurezas proteicas no relacionadas con el producto, ya que en ninguno de los casos se identificó otro pico (Figura 81). Por otro lado, es importante mencionar que no se determinó el contenido de impurezas relacionadas con el proceso, como las proteínas de la célula huésped, virus, endotoxinas o ácidos nucleicos. Por lo tanto, probablemente será necesario realizar un paso de pulido adicional para alcanzar una pureza superior al 99%.

Es importante destacar que la actividad específica de la molécula rhαGAL-L (38 ± 4 UI.mg⁻¹, n= 3) está comprendida dentro del intervalo determinado en este trabajo para la molécula Fabrazyme® (59 ± 20 UI.mg⁻¹, n= 5), y también está incluida dentro de los valores reportados en la literatura (33 - 58 UI.mg⁻¹) [129]. El valor de actividad enzimática específica alcanzado para la molécula rhαGAL-C (100 ± 30 UI.mg⁻¹, n= 3) es superior a los valores reportados. Al realizar el análisis estadístico ANOVA, se tiene una diferencia significativa entre las medias de las tres moléculas con un 95% de confianza ($p= ,034$). Al realizar la prueba de Fisher (LSD, *least significant difference*) se logró identificar una diferencia significativa entre los valores de actividad específica de rhαGAL-L y rhαGAL-C, pero no así entre rhαGAL-L y la molécula de referencia o entre rhαGAL-C y la molécula de referencia, Fabrazyme®. Esto último podría atribuirse a alguna diferencia en la distribución de glicanos cargados o bien en el perfil de isoformas de ambas moléculas. Para un análisis más riguroso será necesario evaluar más de un lote de la molécula comercial.

Por otro lado, según lo obtenido a partir del ensayo de HPLC-C4, la molécula rhαGAL-C sólo presenta las formas incompletas de la proteína. Esto podría correlacionarse con lo reportado por Miyamura y col. (1996) [130], quienes explican un aumento en la actividad enzimática de hasta 6 veces luego de la remoción de 2 a 10 aminoácidos terminales.

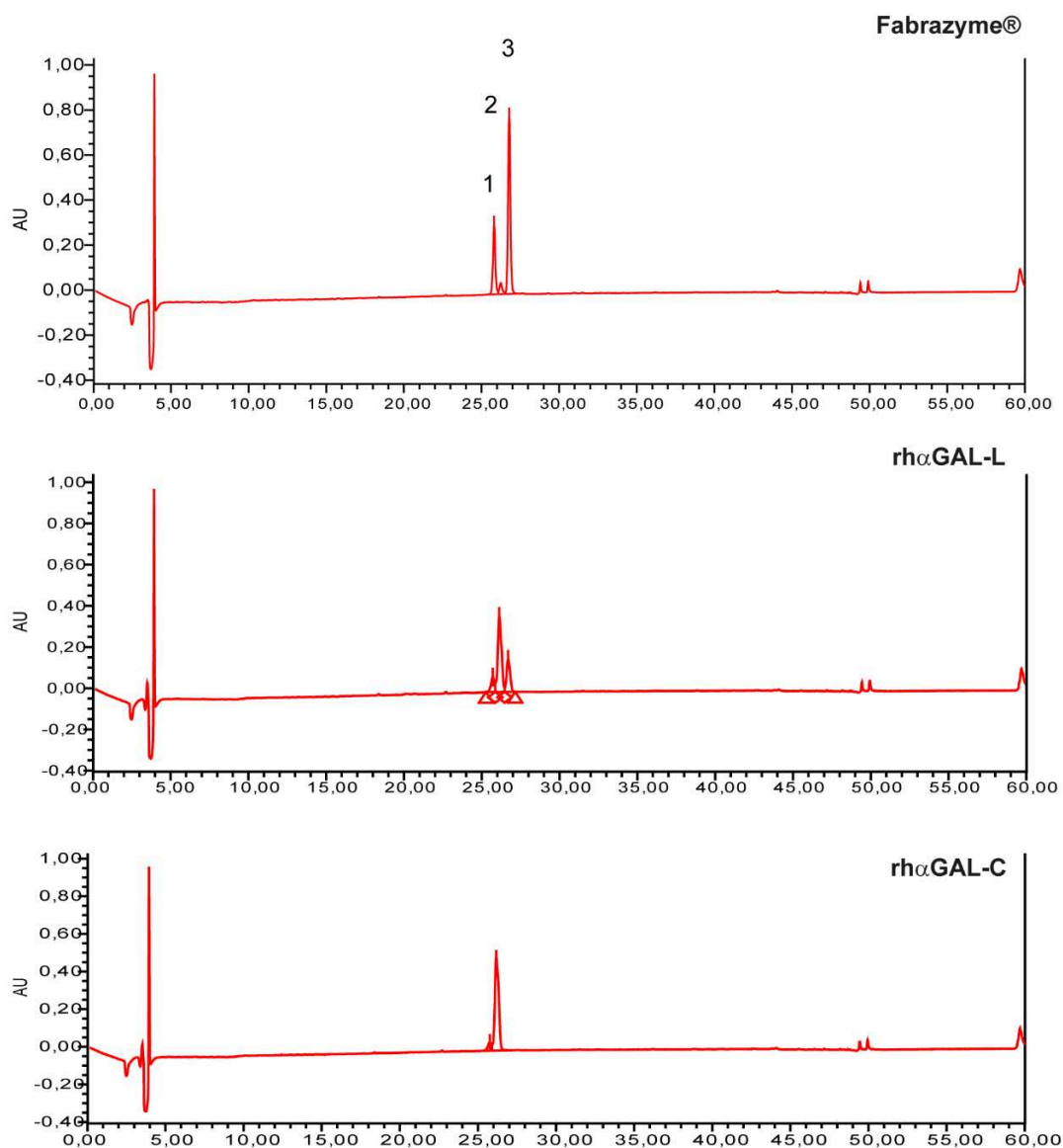


Figura 81. Análisis de Fabrazyme®, rhαGAL-L y rhαGAL-C mediante HPLC en fase reversa.

4. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Uno de los aspectos más importantes al desarrollar un proceso de purificación completo es reducir al máximo posible el número de operaciones unitarias. De esta manera, para alcanzar la máxima pureza empleando el menor número de etapas cromatográficas se combinan técnicas que se basan en diferentes principios y que explotan diferentes propiedades superficiales de las proteínas. Inicialmente, como primer paso de captura, se propuso utilizar un intercambiador aniónico débil, utilizando como material de partida sobrenadante crudo de la línea celular CHO_s GAL TD3 50 (~0,6 UI.mg⁻¹ de rhaGAL) cultivada en medio libre de suero (EX-CELL® 302). Sin embargo, el indicador de pH rojo fenol presente en el medio demostró una fuerte unión a la resina, disminuyendo la capacidad de la misma. Por ese motivo, se propuso como alternativa emplear una cromatografía de pseudoafinidad a colorantes. Si bien fue posible obtener la proteína aparentemente activa (11,8 UI.mg⁻¹) con una recuperación del 71%, para lograrlo fue necesario el empleo de etilenglicol, compuesto cuyo uso estaría desaconsejado con la nueva tendencia, denominada química verde, que busca reducir el empleo de solventes. Asimismo, si se considera una mayor escala de trabajo, el uso de solventes encarece el costo global del proceso de producción. Como consecuencia, se retomó la cromatografía de intercambio iónico débil pero utilizando como material de partida sobrenadante de cultivo de la línea celular CHO_s Gal TD3 50 (~1,15 UI.mg⁻¹ de rhaGAL) cultivada en medio libre de suero (EX-CELL® 302) sin el indicador de pH rojo fenol. Es así que, sobre la base de los resultados preliminares obtenidos, se seleccionó como condición de adsorción una solución de fosfato de sodio 10 mM (pH 6,0), realizando un acondicionamiento de la muestra con solución de equilibrado. Para la recuperación de la enzima, se llevaron a cabo dos protocolos. El primero consistió en realizar una elución en gradiente desde solución fosfato de sodio 10 mM (pH 6,0) hasta solución NaCl 1 M en fosfato de sodio 10 mM (pH 6,0), de manera de determinar correctamente la conductividad iónica necesaria para eluir la completa distribución de isoformas de rhaGAL. Se eligió como condición de elución una solución de NaCl 0,18 M en fosfato de sodio 10 mM (pH 6,0). Se obtuvo la proteína activa (~10 ± 2 UI.mg⁻¹), con una pureza del ~28 ± 6 % y una recuperación (másica) ~94 ± 8 %. Mediante IEF seguido de *western blot*, fue posible verificar que la distribución de isoformas presentes en el material de partida fue idéntica al producto de este paso de purificación.

Para el segundo paso de purificación se seleccionó una cromatografía de interacción hidrofóbica. Se evaluaron dos tipos de resinas con diferente densidad de ligando por ml de resina: *Butyl Sepharose 4 Fast Flow* y *Capto Butyl*. Para todos los casos se realizaron dos protocolos, variando el tipo y concentración de sal. En el

protocolo 1 se trabajó con Na_2SO_4 mientras que en protocolo 2 con NaCl . Esta interacción separa proteínas con diferencias en su hidrofobicidad superficial y se ve aumentada por soluciones con elevada fuerza iónica. Por lo que, para la condición de pegado se trabajó con una solución de elevada fuerza iónica, mientras que la desorción se realizó por descenso de fuerza iónica. Sobre la base de los resultados de recuperación y pureza, se seleccionó la resina *Butyl Sepharose 4 Fast Flow* y la sal NaCl (protocolo 2).

Una vez definido el protocolo final, se purificó la enzima presente en sobrenadantes de cultivo tanto de la línea celular CHO_s GAL TD3 50 (rhαGAL-L) como del clon productor P3G2 (rhαGAL-C). Luego del segundo paso de purificación de ambas moléculas, se alcanzó una recuperación del 60% y una pureza del 98%. Asimismo, mediante HPLC en fase reversa no se identificaron impurezas proteicas no relacionadas al producto, ya que en ninguno de los casos se identificó un pico adicional. Sin embargo, para garantizar una pureza superior al 99% será necesario realizar algún paso de pulido, así como también determinar el contenido de ADN total, virus y HCP.

Por otro lado, es importante destacar que los valores de actividad enzimática específica de ambas moléculas se hallan comprendidos dentro de los valores calculados para la molécula de referencia, y también están incluidos dentro de los valores reportados en la literatura.

Por último, como ya se mencionó, durante el desarrollo del protocolo de purificación se trabajó a un tiempo de residencia de 10 min de manera de garantizar una adecuada interacción entre la proteína y el ligando: cuanto mayor sea el tiempo de contacto de la enzima con la matriz, más cercano al equilibrio se encontrará el sistema. Sin embargo, se debe tener en cuenta que en escala industrial menores flujos (mayores tiempos de residencia), enlentecen el proceso de producción, aumentando la difusión axial y pudiendo conducir a la inactividad del producto de interés. A su vez, se trabajó a una capacidad teórica de $1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de resina. Por lo tanto, será necesario optimizar los parámetros de flujo, capacidad de carga, resolución y costos del proceso, facilitando el posterior escalamiento. Así, será esencial el estudio de la capacidad máxima mediante isotermas de adsorción en el equilibrio en modo *batch*, y el estudio de la influencia de variables operacionales como el flujo o la concentración de la muestra mediante la determinación de la capacidad dinámica (curvas de *breakthrough*). En general, el escalamiento del proceso cromatográfico involucra el incremento del diámetro de las columnas manteniendo constante su longitud, y el aumento de la capacidad de carga hasta alcanzar una resolución aceptable.

En la siguiente sección se detallan los experimentos llevados a cabo para la caracterización fisicoquímica y bioquímica de la enzima pura.

RESULTADOS PARTE 4

“Caracterización de rhoGAL purificada”

Existe un amplio rango de análisis fisicoquímicos y estructurales que permiten caracterizar un producto proteico, proporcionando información sobre la composición, propiedades físicas y la estructura primaria (o de orden superior). En los primeros estadios de desarrollo del producto, el principal objetivo consiste en identificar el compuesto activo y desarrollar métodos adecuados que garanticen la mejor caracterización posible. En etapas posteriores, el objetivo es determinar la microheterogeneidad del producto y las impurezas asociadas con el proceso de producción. En el caso particular de productos biosimilares, es decir, aquellos productos medicinales de origen biológico similares a un producto ya autorizado para su comercialización (producto de referencia), es necesario garantizar la comparabilidad en calidad, seguridad y eficacia con el producto innovador.

La estructura primaria de las proteínas, es decir, la secuencia lineal de aminoácidos constitutivos (desde el aminoácido *N*-terminal al *C*-terminal), se puede determinar mediante degradación de Edman o espectrometría de masa. Para el estudio de la estructura secundaria y terciaria de las proteínas existen numerosas técnicas analíticas, tales como la cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear (RMN), espectrofotometría UV-visible, fluorescencia, dispersión dinámica de la luz (DLS, *Dynamic light scattering*), dicroísmo circular (DC) o espectroscopía infrarroja IR, siendo las más utilizadas DC y fluorescencia. La fluorescencia intrínseca de los aminoácidos Trp, Tyr o Phe puede ser utilizada para el estudio de la estructura terciaria de las proteínas. A su vez, existen numerosos procedimientos disponibles para el estudio de la microheterogeneidad, incluyendo varias técnicas cromatográficas (cromatografía de exclusión molecular (SEC, *size exclusion chromatography*), iónica (IEX), hidrofóbica (HIC), hidrofílica (HILIC, *hydrophilic interaction liquid chromatography*), de intercambio aniónico de alta resolución (HPAEC, *high-performance anion exchange chromatography*) y de afinidad), electroforéticas (SDS-PAGE, IEF, 2D-PAGE, electroforesis capilar, entre otras), complementadas con diversas técnicas de detección como arreglo de diodos (DAD, *diode array detection*), detección múltiple (MALLS, *multi-angle laser light scattering*) o masa (MSⁿ) [131].

Por otro lado, la cuantificación de proteínas es un requisito básico durante el desarrollo del fármaco. Actualmente, no existe ningún método estandarizado que sea adecuado para cuantificar todas las proteínas ya que dependerá de sus propiedades fisicoquímicas y su microheterogeneidad. Normalmente se suele cuantificar mediante espectrofotometría UV (el cual no es específico de una proteína, sino que en una

mezcla compleja no solo cuantificará la proteína de interés sino también impurezas proteicas y ADN residual) o cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, *high performance liquid chromatography*). También, se pueden emplear ensayos colorimétricos como el ensayo de Bradford que emplea colorante azul brillante *Coomasie* G-250, el cual al interactuar con las proteínas genera un cambio de color. Sin embargo, al igual que la medición por absorbancia UV, estos métodos tampoco son específicos para cuantificar una proteína de interés. Un método alternativo es la cuantificación mediante la técnica ELISA. La elección del método de cuantificación depende de diversos factores, incluyendo el estadio de desarrollo del producto. En todos los casos es necesaria la optimización y validación del método seleccionado.

Finalmente, para determinar la actividad biológica de la proteína se suelen utilizar ensayos de proliferación celular *in vitro* y ensayos en modelos animales (*in vivo*). Asimismo, determinar la inmunogenicidad del bioterapéutico es esencial para garantizar la seguridad y eficacia del producto. Ésta se encuentra influenciada por factores extrínsecos, es decir, aquellos relacionados con el paciente y el tratamiento, tales como su estado inmunológico, vía de administración de la droga y dosis, y factores intrínsecos, como presencia de posibles agregados, impurezas derivadas del huésped celular o del proceso de purificación, modificaciones post-traduccionales. Normalmente, se suelen utilizar ensayos de ELISA, estudios de proliferación celular *in vitro* o *in vivo* (ratones transgénicos).

De esta manera, una vez definido el protocolo de purificación, se determinó el grado de pureza alcanzado y se llevaron a cabo diversas metodologías con el objetivo de caracterizar la enzima rhaGAL pura.

1. Caracterización fisicoquímica

1.1. SDS-PAGE e IEF

A partir de los ensayos SDS-PAGE e IEF seguidos de tinción por azul brillante de *Coomasie* fue posible determinar la masa molecular aparente de las moléculas purificadas y el perfil de isoformas, en comparación con la molécula de referencia Fabrazyme®. La masa molecular aparente alcanzada fue similar, observando un monómero de 50 KDa, aproximadamente. Al igual que lo reportado por Sohn y col. (2013) [105], Fabrazyme® evidenció una segunda banda de menor masa molecular, la cual se puede atribuir a la estabilidad reducida luego del almacenamiento en el vial (en forma liofilizada). Asimismo, se observó idéntica movilidad electroforética luego del tratamiento con la enzima PNGasa F, la cual escinde glicanos unidos mediante enlaces de tipo N (Figura 82). Notablemente, en las tres moléculas digeridas con PNGasa F se observó un patrón heterogéneo de bandas, lo que puede atribuirse a la

baja estabilidad de la enzima a las altas temperaturas, ya que como se explica en la sección *Materiales y Métodos*, para realizar la *N*-deglicosilación se debe incubar previamente la proteína de interés con solución desnaturalizante y calentar a 100°C durante 10 min.

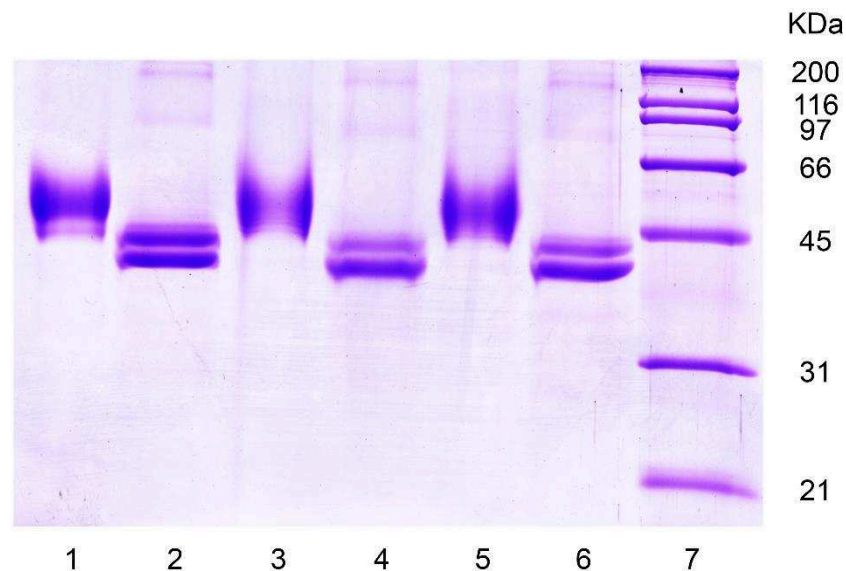


Figura 82. Comparación de la masa molecular aparente de las fracciones purificadas sin tratamiento y con tratamiento con PNGasa F. Calles: 1- Fabrazyme®; 2- Fabrazyme® tratado con PNGasa F; 3- rhαGAL-L; 4- rhαGAL-L tratado con PNGasa F; 5- rhαGAL-C; 6- rhαGAL-C tratado con PNGasa F; 7- Marcadores de masa molecular (Bio-Rad).

Por otro lado, tanto rhαGAL-L como Fabrazyme®, exhibieron similar perfil de isoformas, con una diversidad de variantes hiperglicosiladas de bajo pI. No obstante, aunque ambas enzimas comparten un número considerable de isoformas, rhαGAL-L mostró una mayor proporción de glicofomas concentradas en la zona más ácida del rango de pH en comparación con Fabrazyme® (Figura 83).

No fue posible evaluar el perfil de isoformas de la molécula rhαGAL-C, por no contar con los anfolitos necesarios para realizar el gradiente de pH en el momento adecuado.

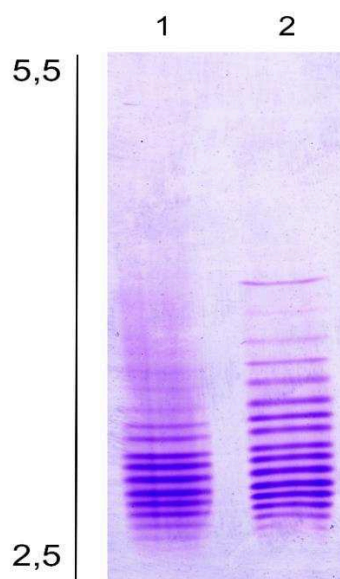


Figura 83. Análisis del perfil de isoformas de rhαGAL-L. Se comparó el perfil de isoformas de rhαGAL-L (1) y Fabrazyme® (2), respectivamente. La línea indica el rango de pH empleado.

1.2. Espectrofluorimetría

Debido a que el perfil de fluorescencia es extremadamente sensible a perturbaciones en el entorno proteico, proporciona una evidencia simple y poderosa que permite el estudio del grado de variabilidad estructural entre diferentes lotes de una proteína dada. Asimismo, permite realizar estudios de comparabilidad y biosimilitud [132]. La enzima rhαGAL presenta 16 residuos Trp, dos de los cuales se hallan expuestos al solvente [133]. Los espectros de emisión de rhαGAL-L, rhαGAL-C y Fabrazyme® se registraron de 290 a 500 nm cada 1 nm, utilizando una longitud de onda de excitación de 278 nm. La composición estructural de las tres moléculas, determinada por espectroscopía de fluorescencia, demostró ser similar, no observándose diferencias entre el pico máximo (345 nm). Los tres espectros resultaron prácticamente superpuestos (Figura 84).

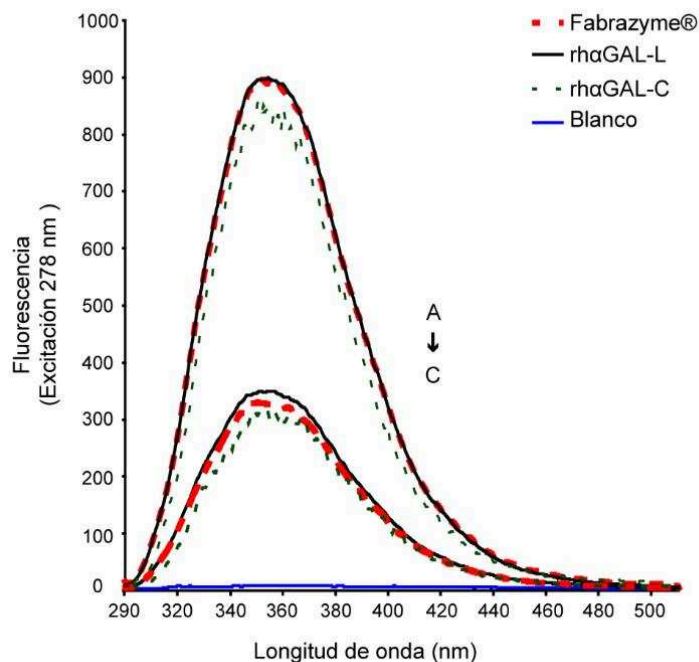


Figura 84. Espectro de emisión fluorescente de Fabrazyme®, rhaGAL-L y rhaGAL-C en solución tampón fosfato de sodio. 1 μ M proteína (A); 0,25 μ M proteína (B); blanco (C).

2. Caracterización bioquímica

2.1. Parámetros cinéticos

Durante la purificación y subsiguiente almacenamiento, diversos procesos pueden alterar o interferir con la actividad de la enzima. Para verificar esto, se compararon los parámetros cinéticos de rhaGAL-L y rhaGAL-C con los correspondientes a Fabrazyme®. La enzima purificada (rhaGAL-L y rhaGAL-C) siguió un comportamiento de tipo Michaelis-Menten, demostrando su capacidad de hidrolizar el sustrato sintético (4MU- α -Gal) a una velocidad comparable con la de Fabrazyme®. Para estimar los parámetros cinéticos, como se mencionó en la sección *Resultados parte 1*, se aplicó tanto la ecuación de dobles recíprocos de Lineweaver-Burk (Tabla 23) como la ecuación de Eadie Hofstee (Tabla 24). La Figura 85 muestra las gráficas de la cinética de saturación, de dobles recíprocos y de Eadie Hofstee para Fabrazyme®, rhaGAL-L y rhaGAL-C.

Tabla 23. Parámetros cinéticos enzima pura (Lineweaver-Burk).

| | K_m (mM) | K_{cat} (min⁻¹) | K_{cat}/K_m (min⁻¹.mM⁻¹) |
|-------------------|-------------------------------------|---|---|
| Fabrazyme® | 1,5 ± 0,6 | 1200 ± 300 | 800 ± 300 |
| rhαGAL-L | 1,3 ± 0,1 | 1400 ± 400 | 1100 ± 300 |
| rhαGAL-C | 1,1 ± 0,3 | 1000 ± 600 | 900 ± 600 |
| p-valor | ,5866 [#] | ,6527 [*] | ,7615 [*] |

*ANOVA. [#]Prueba de Kruskal-wallis. Los valores son resultados de tres mediciones independientes, cada una realizada por duplicado.

Tabla 24. Parámetros cinéticos enzima pura (Eadie Hofstee).

| | K_m (mM) | K_{cat} (min⁻¹) | K_{cat}/K_m (min⁻¹.mM⁻¹) |
|-------------------|-------------------------------------|---|---|
| Fabrazyme® | 1,4 ± 0,2 | 1200 ± 200 | 800 ± 200 |
| rhαGAL-L | 1,4 ± 0,3 | 1400 ± 500 | 1000 ± 200 |
| rhαGAL-C | 1,7 ± 0,6 | 1300 ± 200 | 900 ± 600 |
| p-valor | ,7288 [#] | ,7207 [*] | ,5557 [#] |

*ANOVA. [#]Prueba de Kruskal-wallis. Los valores son resultados de tres mediciones independientes, cada una realizada por duplicado.

2.2. Estabilidad en plasma

Se evaluó la estabilidad de las moléculas en plasma (37°C), ensayo que permite evaluar fundamentalmente la estabilidad de la proteína frente a proteasas séricas. La molécula rhαGAL-L presentó la misma estabilidad que la molécula Fabrazyme® ($p > ,05$), no así la molécula rhαGAL-C ($p < ,05$) (Figura 86). Al realizar la prueba de Fisher (LSD, *least significant difference*) se identificó una diferencia estadísticamente significativa (con un 95% de confianza), tanto a los 60 min como a los 45 min, para la molécula rhαGAL-C con respecto a Fabrazyme® y rhαGAL-L.

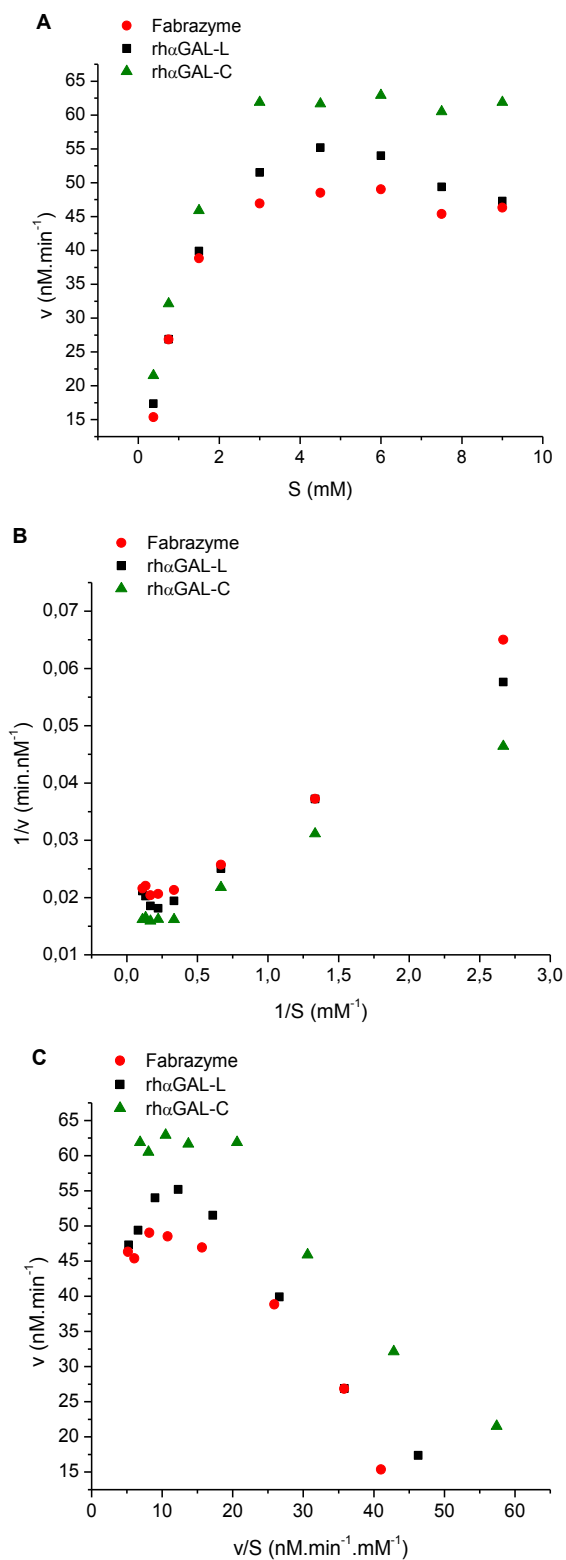


Figura 85. Gráfica de cinética de saturación (A), Lineweaver-Burk (B) y Eadie Hofstee (C) de la molécula de referencia Fabrazyme®, rhoGAL-L y rhoGAL-C.

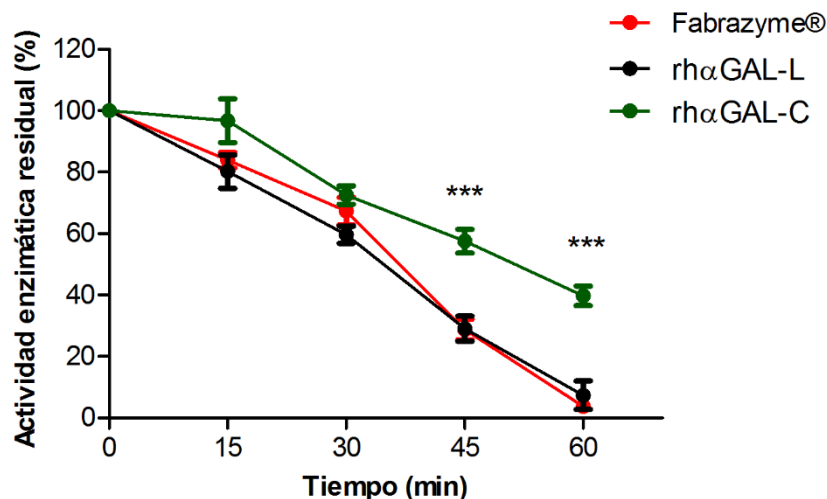


Figura 86. Estabilidad *in vitro* de Fabrazyme®, rhαGAL-L y rhαGAL-C en plasma humano. La estabilidad se determinó como la actividad enzimática remanente luego de la incubación en plasma humano durante el tiempo indicado. El resultado se expresó como el porcentaje de la actividad enzimática inicial. Los resultados son el promedio de 6 mediciones \pm SD. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas.

3. Análisis de la glicosilación

3.1. Manosa-6-fosfato y ácido siálico

El ácido siálico y la M6P son residuos clave para el éxito de la terapia de reemplazo enzimático para la enfermedad de Fabry, por lo que es crucial determinar su contenido. El contenido de M6P es esencial para promover la captación de rhαGAL hacia los lisosomas por parte de los receptores de M6P presentes en membrana plasmática. El ácido siálico es fundamental para enmascarar la galactosa terminal, reduciendo la captación de la proteína por el receptor de la asialoglicoproteína del hígado. Esto otorga una mayor vida media en suero y permite garantizar una adecuada distribución tisular. Por otra parte, cuando el huésped de producción empleado no es de origen humano, como es el caso de las células CHO-K1, deben controlarse las cantidades de la variante de ácido siálico denominada Neu5Gc (ácido *N*-glicolilneuramínico), que resulta un epítipo inmunogénico para humanos debido a la falta de la enzima requerida para su síntesis. Por lo tanto, el Neu5Gc constituye un residuo antigénico, cuya proporción debe cuantificarse y controlarse para evitar el fracaso de la terapia.

El patrón de glicosilación determinado por IEF (Figura 83) permitió evidenciar que rhαGAL-L presentó un perfil similar de glicanos cargados en comparación con Fabrazyme®, con una mayor proporción de glicofomas ácidas.

El contenido de M6P de las dos moléculas purificadas fue similar al valor determinado para la molécula de referencia Fabrazyme® (4 ± 2 (n= 4), $3,8 \pm 0,7$ (n= 6))

y $3,4 \pm 0,3$ (n=6) mol M6P por mol de proteína para Fabrazyme®, rhaGAL-L y rhaGAL-C y, respectivamente; p=, 66, Kruskal-Wallis).

Por otro lado, el contenido de ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac) para rhaGAL-L y rhaGAL-C resultó aproximadamente un 50% mayor que lo reportado para la molécula de referencia ($6,7 \pm 0,8$ (n= 7), 10 ± 1 (n= 8) y 10 ± 3 (n= 6) mol Neu5Ac por mol de proteína para Fabrazyme®, rhaGAL-L y rhaGAL-C, respectivamente; p=, 0036, ANOVA). El contenido de Neu5Gc de la molécula rhaGAL-L representó sólo un 33% de los niveles de esta variante de ácido siálico determinados para Fabrazyme® (p=,02; ANOVA), mientras que el contenido de Neu5Gc de la molécula rhaGAL-C representó un 54% (Tabla 25). Asimismo, el contenido de Neu5Gc con respecto al ácido siálico total (Neu5Gc + Neu5Ac) de cada molécula, representó un 1,5%, 0,3% y 0,5% para Fabrazyme®, rhaGAL-L y rhaGAL-C, respectivamente.

3.2. Monosacáridos

En relación a la composición de monosacáridos, no se encontraron diferencias significativas en cuanto al contenido de Manosa (Man) (p=,61; Kruskal-Wallis), Galactosa (Gal) (p=,293; Kruskal-Wallis) ni *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) (p=,116; Kruskal-Wallis) entre las tres moléculas. El contenido de Fucosa (Fuc) fue un 75% superior para rhaGAL-L con respecto al correspondiente a Fabrazyme® (p= ,0359; ANOVA), mientras que los niveles determinados para la molécula rhaGAL-C no presentaron una diferencia significativa con respecto a los de Fabrazyme® (Tabla 25).

3.3. Análisis y composición del perfil de *N*-glicanos

Para evaluar el patrón de sialilación y fosforilación de rhaGAL-L y rhaGAL-C en comparación con Fabrazyme®, los *N*-glicanos de cada molécula se aislaron y se marcaron con el fluoróforo 2-AB, como se describe en el apartado 8.3.3 de la sección *Materiales y Métodos*. Luego los glicanos marcados con 2-AB nativos (sin tratar) se analizaron por cromatografía de intercambio aniónico débil (WAX, *weak anion exchange*) y se separaron de acuerdo con su carga. Los glicanos se identificaron como estructuras neutras (asialo-), mono-, di-, tri-, tetrasialiladas y de alto contenido de manosa monofosforiladas, usando estándares apropiados.

Como se puede observar en la Figura 87, el perfil de *N*-glicanos cargados fue similar en las distintas muestras. Sin embargo, se determinó un mayor contenido de *N*-glicanos cargados con respecto a los neutros para la molécula rhaGAL-L y rhaGAL-C en comparación con la molécula de referencia Fabrazyme®. Fabrazyme® presentó un 18% de estructuras neutras, 12% mono-sialiladas, 34,5% bi-sialiladas, 18% tri-sialiladas y 4,1% tetra-sialiladas. La molécula rhaGAL-L presentó un promedio de 8%

de estructuras neutras, 13% mono-sialiladas, 43,3% bi-sialiladas, 17,7% tri-sialiladas y 6% tetra-sialiladas. La molécula rhaGAL-C presentó 8,9% de estructuras neutras, 14,1% mono-sialiladas, 49,7% bi-sialiladas, 15,8% tri-sialiladas y 4,5% tetra-sialiladas (Tabla 26).

Tabla 25. Análisis del contenido y composición de monosacáridos de Fabrazyme®, rhaGAL-L y rhaGAL-C.

| Monosacárido (mol. mol rhaGAL⁻¹) | Fabrazyme® | rhaGAL-L | rhaGAL-C |
|--|-------------------|-----------------|-----------------|
| M6P | 4 ± 2 | 3,8 ± 0,7 | 3,4 ± 0,3 |
| Neu5Ac | 6,7 ± 0,8 | 10 ± 1 | 10 ± 3 |
| Neu5Gc | 0,10 ± 0,02 | 0,031 ± 0,005 | 0,054* |
| Fuc | 1,2 ± 0,4 | 2,1 ± 0,7 | 1,5 ± 0,3 |
| Gal | 10 ± 2 | 12,0 ± 0,3 | 11,4 ± 0,3 |
| Man | 15 ± 4 | 14 ± 1 | 14 ± 1 |
| GlcNAc | 8 ± 2 | 11 ± 1 | 7,2 ± 0,5 |
| Ácido siálico# : Gal | 0,66 | 0,81 | 0,90 |

*El contenido de Neu5Gc de la molécula rhaGAL-C sólo se determinó por uniplicado.

#Ácido siálico total (Neu5Gc + Neu5Ac).

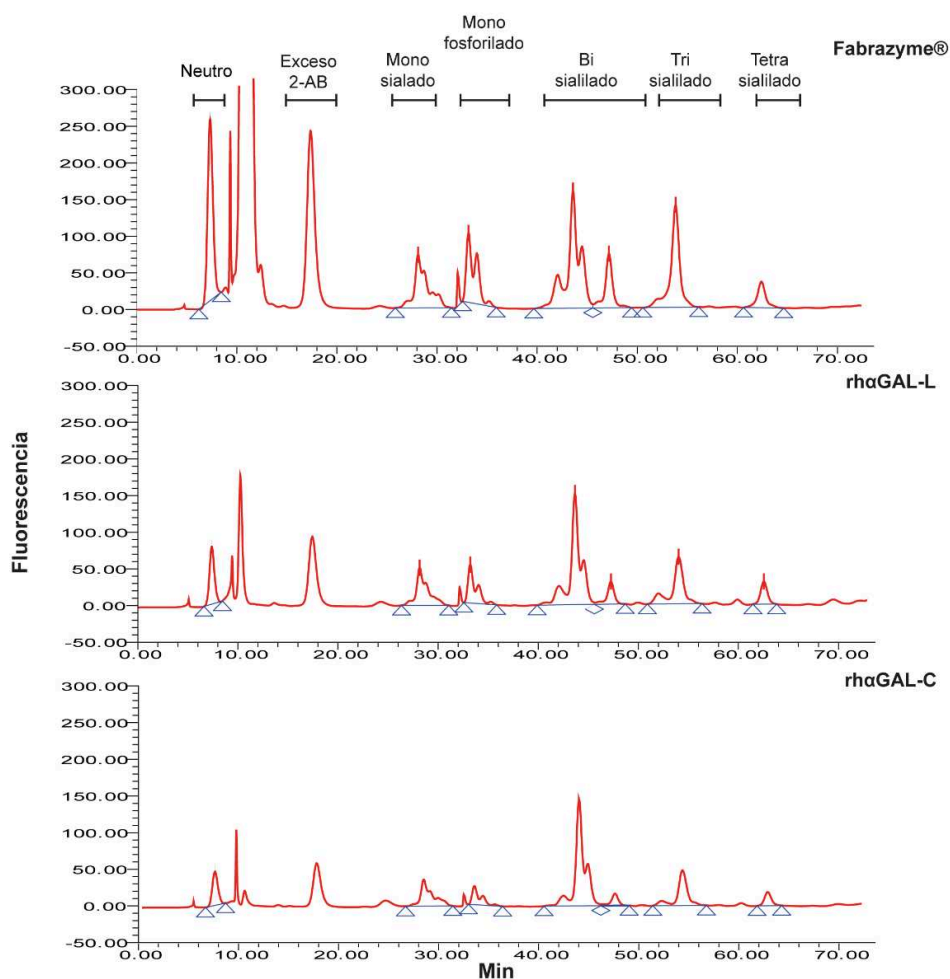


Figura 87. Análisis de *N*-glicanos (marcados con 2-AB) de Fabrazyme®, rhaGAL-L y rhaGAL-C por WAX-HPLC. Los *N*-glicanos se separaron de acuerdo a su carga.

Tabla 26. Contenido de *N*-glicanos (marcados con 2-AB) de Fabrazyme®, rhaGAL-L y rhaGAL-C determinados por WAX-HPLC.

| <i>N</i> -glicanos (%) | Fabrazyme® | rhaGAL-L | *rhaGAL-C |
|------------------------|------------|------------|-----------|
| Neutro | 18 ± 1 | 8 ± 3 | 8,9 |
| Mono-sialilado | 12 ± 2 | 13 ± 1 | 14,1 |
| Mono-fosforilado | 14 ± 2 | 12 ± 2 | 7,1 |
| Bi-sialilado | 34,5 ± 0,6 | 43,3 ± 0,2 | 49,7 |
| Tri-sialilado | 18 ± 1 | 17,7 ± 0,5 | 15,8 |
| Tetra-sialilado | 4,1 ± 0,2 | 6 ± 2 | 4,5 |

*El contenido de *N*-glicanos cargados de la molécula rhaGAL-C sólo se realizó por uniplicado.

La identificación de las estructuras mono-fosforiladas se realizó comparando los tiempos de retención con los patrones de referencia (oligmannosidic standard, TheraProteins, Portugal) y sobre la base del perfil obtenido a partir de los glicanos marcados con 2-AB tratados con TFA 2% (v/v) o fosfatasa alcalina (ALP, *alkaline*

phosphatase) . Luego del tratamiento con TFA 2% (v/v) sólo se observaron dos picos: el primero correspondió a glicanos neutros y el segundo (entre treinta y cuarenta min) a glicanos monofosforilados con alto contenido de manosa. Asimismo, el pico entre 30 y 40 min desapareció después del tratamiento con fosfatasa alcalina, pero se observaron los picos correspondientes a estructuras sialiladas (Figuras 88 y 89).

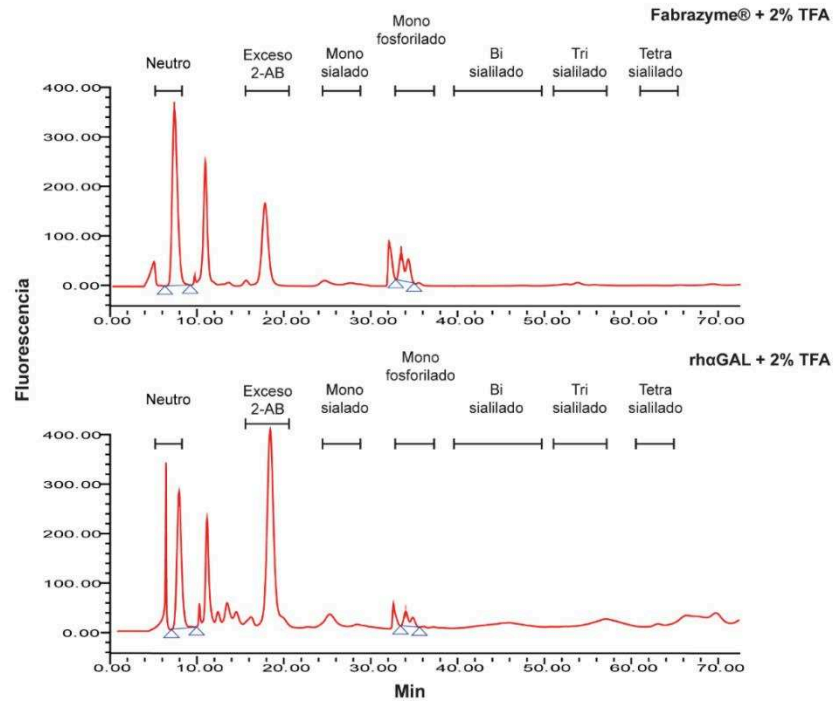


Figura 88. Análisis de N-glicanos (marcados con 2-AB) e hidrolizados con TFA 2% (v/v) de Fabrazyme® y rhaGAL-L por WAX-HPLC.

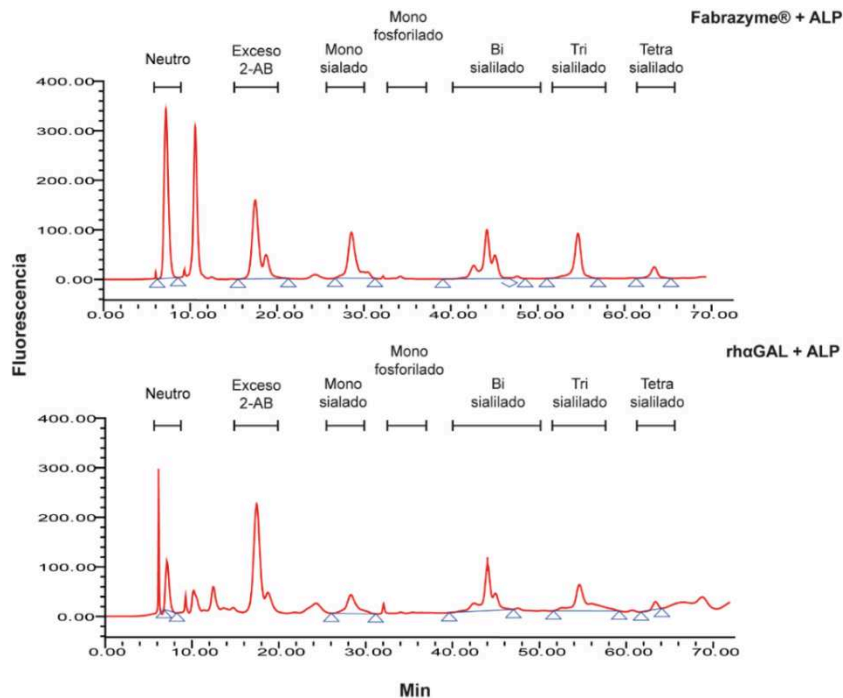


Figura 89. Análisis de N-glicanos (marcados con 2-AB) y tratados con fosfatasa alcalina de Fabrazyme® y rhaGAL-L por WAX-HPLC.

La molécula rhaGAL-L presentó similar proporción de *N*-glicanos monofosforilados con respecto a la molécula de referencia, siendo menor en el caso de la molécula rhaGAL-C (14%, 12% y 7,1% para Fabrazyme®, rhaGAL-L y rhaGAL-C, respectivamente) (Figura 87 y Tabla 26).

4. Ensayo de valoración biológica: ensayo de internalización celular

Para que la administración exógena de rhaGAL sea efectiva en el tratamiento de la enfermedad de Fabry, la enzima debe ser captada por las células y transportada hacia los lisosomas en donde cataliza la hidrólisis de las uniones alfa-galactosídicas de los glicolípidos. Esto es llevado a cabo mediante la interacción de los residuos de M6P presentes en los glúcidos de la enzima con los receptores de M6P de la superficie celular, lo que indica la importancia de una correcta glicosilación para que la enzima sea funcional. Por lo tanto, la actividad enzimática *in vitro* no necesariamente es un reflejo de la bioactividad de la proteína, ya que la ausencia de modificaciones post-traduccionales adecuadas afecta la captura de la enzima por las células blanco.

En primer lugar, como se mencionó en la sección *Resultados parte 1*, se llevó a cabo la puesta a punto de dicho ensayo empleando células HEK293T/17. Las mismas fueron seleccionadas por tratarse de una línea establecida proveniente de células de riñón humano. Debido a que estas células no presentan deficiencia enzimática (como es en el caso de células provenientes de pacientes con enfermedad de Fabry), fue necesario realizar un control que permitiera determinar el contenido basal de la enzima α -Galactosidasa A en las mismas. Luego de 24 h de incubación con diferentes diluciones de las muestras de rhaGAL, las células fueron lisadas en baño de sonicación durante 20 min. Posteriormente, se evaluó la actividad enzimática tanto en los lisados como en los sobrenadantes celulares. En la Tabla 27 se muestran los valores de actividad enzimática específica medida en los lisados celulares y sobrenadante de cultivos, luego de 24 h de incubación en ausencia de enzima (control de células HEK293T/17 sin tratar) y en presencia de 0,12 UI.ml⁻¹ de cada muestra. Como se puede observar, la actividad asociada a las células HEK293T/17 sin tratar fue menor, incrementándose cuando la enzima se adicionó al medio de cultivo.

Tabla 27. Efecto de Fabrazyme®, rhαGAL-L y rhαGAL-C en cultivo de células HEK293T/17 luego de 24 h de incubación.

| Muestra | Actividad Específica | |
|-------------------------|---|--------------------------------------|
| | Sobrenadante cultivos (U.mg ⁻¹) | Lisado celular (U.mg ⁻¹) |
| HEK293T/17 (sin tratar) | 0,01 ± 0,02 | 400 ± 100 |
| Fabrazyme® | 6,9 × 10 ² ± 20 | 5,9 × 10 ³ ± 200 |
| rhαGAL-L | 7,8 × 10 ² ± 70 | 2,40 × 10 ³ ± 40 |
| rhαGAL-C | 0,6 × 10 ² ± 4 | 7 × 10 ² ± 500 |

Las curvas dosis-respuesta en sobrenadantes y lisados celulares correspondientes a las diferentes muestras se presentan en las Figuras 90 y 91. En las mismas se puede observar que la molécula rhαGAL-L presentó similar comportamiento al de la molécula de referencia Fabrazyme®. Por el contrario, se observó menor actividad, tanto en los lisados como en los sobrenadantes de cultivos, cuando las células fueron incubadas con la molécula rhαGAL-C.

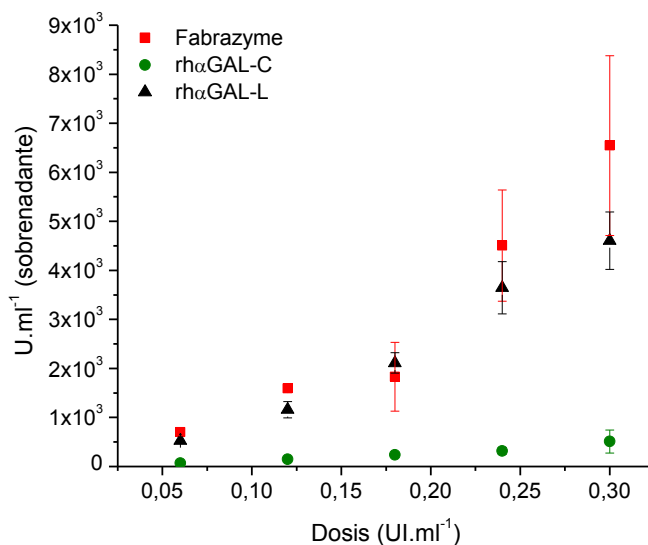


Figura 90. Curva dosis-respuesta de Fabrazyme®, rhαGAL-L y rhαGAL-C en sobrenadante de cultivos.

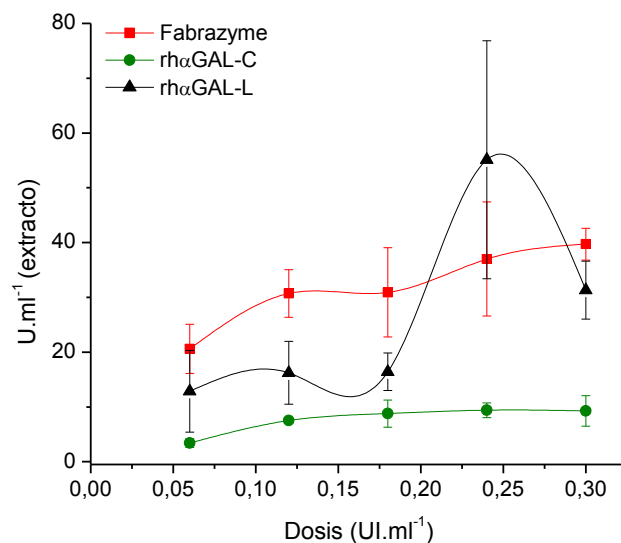


Figura 91. Curva dosis-respuesta de Fabrazyme®, rhαGAL-L y rhαGAL-C en lisados celulares.

De igual manera, se midieron los niveles de actividad específica en lisados de fibroblastos de pacientes con la enfermedad de Fabry y en sobrenadante de cultivos luego de 24 h de incubación con 0,12 UI.ml⁻¹ de enzima (Tabla 28). En este caso, la actividad específica asociada a los lisados celulares fue menor a los valores obtenidos para células HEK293T/17. Esta diferencia podría estar asociada a una variación de la densidad de receptores de M6P en membrana plasmática para cada tipo celular.

Al realizar la prueba estadística ANOVA se determinó una diferencia significativa entre las medias de las cuatro condiciones (control y lisado celular tratado con las tres moléculas) ($p = ,0008$). Se obtuvo un mayor valor de actividad específica luego de incubar las células con rhαGAL-L, siendo los valores obtenidos muy similares luego de 24 h de incubación con rhαGAL-C o Fabrazyme® (Tabla 28).

Para confirmar que la enzima es internalizada y dirigida hacia lisosomas de fibroblastos de pacientes, se realizó un ensayo de inmunofluorescencia. Tanto en la población celular incubada con la molécula de referencia Fabrazyme® como en aquellas tratadas con ambas moléculas purificadas, se observó un patrón granular característico de localización en lisosomas (Figura 92).

Tabla 28. Efecto de Fabrazyme®, rhαGAL-L y rhαGAL-C en cultivo de fibroblastos de pacientes con la enfermedad de Fabry luego de 24 h de incubación.

| Muestra | Actividad Específica Sobrenadante cultivos (U.mg ⁻¹) | Actividad Específica Lisado celular (U.mg ⁻¹) |
|---------------------------|--|---|
| Fibroblastos (sin tratar) | 57 ± 5 | 386 ± 4 |
| Fabrazyme® | 200 ± 20 | 478 |
| rhαGAL-L | 155 ± 2 | 528 ± 4 |
| rhαGAL-C | 206 ± 6 | 460 ± 10 |

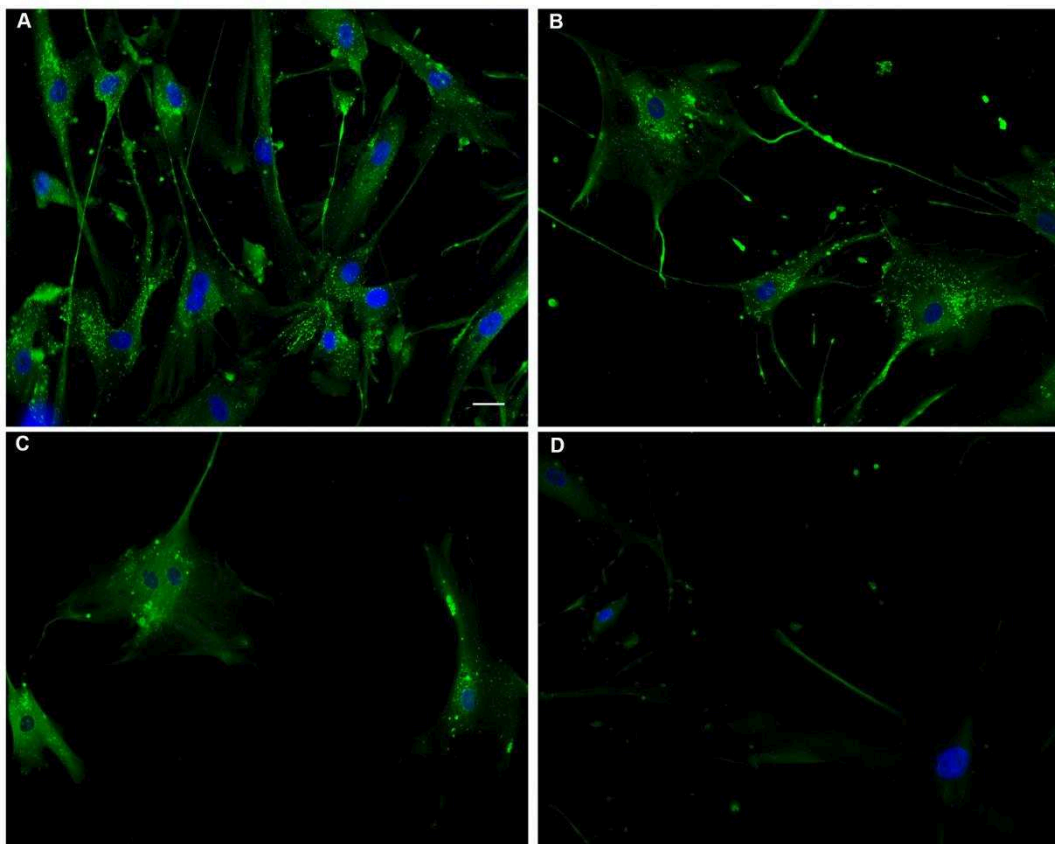


Figura 92. Análisis de la localización subcelular por microscopía de fluorescencia en fibroblastos de pacientes con la enfermedad de Fabry luego de 24 h de incubación con 0,12 UI.ml⁻¹ de Fabrazyme® (A), rhαGAL-L (B), rhαGAL-C (C) y control sin tratar (D). Las células se incubaron con un anticuerpo policlonal de conejo anti-rhαGAL y posteriormente con un anticuerpo secundario *Alexa Fluor488 goat anti-rabbit igG H and L* (ab 150081). Se realizó una tinción diferencial de núcleos con Hoechst. Se muestran la superposición de ambas tinciones. La escala corresponde a 19 μm.

5. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS- CONCLUSIONES PARCIALES

Los resultados obtenidos en esta última etapa fueron exitosos y complementarios a los obtenidos en las secciones anteriores, ya que permitieron concluir que el proceso de producción permite obtener una proteína pura y activa, con propiedades fisicoquímicas y bioquímicas similares a una de las variantes utilizadas en la TRE para la enfermedad de Fabry (Fabrazyme®, Genzyme).

Se confirmó que ambas enzimas purificadas presentaron un comportamiento cinético tipo Michaelis-Menten, al igual que la molécula de referencia. La composición estructural de las tres moléculas, determinada por espectroscopía de fluorescencia, demostró ser similar. Con respecto al estudio de estabilidad frente a proteasas, la molécula rhαGAL-L no presentó variaciones en comparación con la molécula de referencia, mientras que la molécula rhαGAL-C presentó una estabilidad significativamente mayor.

Por otro lado, ambas moléculas purificadas mostraron propiedades mejoradas con respecto al perfil de glicosilación de la molécula de referencia Fabrazyme®. El contenido de M6P de ambas proteínas fue similar al valor determinado para Fabrazyme®; no obstante, las dos moléculas obtenidas presentaron un mayor contenido de ácido siálico Neu5Ac y una menor proporción de la variante inmunogénica Neu5Gc, atributos que podrían contribuir a una mejora de la eficacia *in vivo* de la terapia. Asimismo, el tratamiento de cultivos celulares *in vitro* con las tres enzimas demostró un aumento de la actividad enzimática específica, tanto en células HEK293T/17 como en fibroblastos de pacientes con la enfermedad de Fabry. Además, se confirmó la internalización y localización subcelular de las enzimas mediante microscopía de inmunofluorescencia, presentando un patrón granular característico de localización en lisosomas.

De esta manera, esta tecnología podría proponerse como una alternativa para el establecimiento de un proceso de producción de la enzima rhαGAL para uso terapéutico.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los medicamentos destinados al tratamiento de las enfermedades raras, llamados medicamentos huérfanos, son una preocupación y un desafío para la comunidad médica ya que a menudo son difíciles de descubrir, desarrollar y comercializar. Asimismo, la investigación básica destinada al estudio de este tipo de enfermedades recibe relativamente poca atención y apoyo financiero tanto en la academia como en la industria [134]. En particular, en Argentina existen dos leyes relativas a esta problemática, la Ley 26.689 para el cuidado de las personas con EPF y la Ley 26.688 que declara de interés nacional la investigación y producción pública de medicamentos, materias primas, vacunas y productos médicos. Sin embargo, a diferencia de otros países, no existen incentivos de tipo regulatorio, económico o comercial.

La TRE, a partir de la cual la enzima mutada o ausente es reemplazada por la administración exógena de una variante recombinante en forma crónica al paciente, ha sido empleada para el tratamiento de desórdenes de almacenamiento lisosomal desde comienzos de los años '90 para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher [53]. En el caso de la enfermedad de Fabry, desorden producido por una alteración en el catabolismo de los esfingolípidos como resultado de la actividad defectiva de la enzima α -Galactosidasa A, desde el año 2001 la TRE está disponible para su tratamiento. Se han desarrollado dos presentaciones comerciales: *agalsidase beta* (Fabrazyme®; Genzyme Corporation) y *agalsidase alfa* (Replagal®; Shire Human Genetic Therapies) [81]. Asimismo, existe una tercera versión recombinante, *pegunigalsidase alfa* (PRX-102, Protalix, Biotherapeutics) que se encuentra en estadios avanzados de desarrollo (fase clínica III) [11]. Sin embargo, este tipo de terapias presentan algunas desventajas relacionadas con la eficacia limitada en pacientes en un estadio avanzado de la enfermedad, la corta vida media en circulación, debido fundamentalmente a la captación de la proteína por el receptor de la asialoglicoproteína del hígado, y los elevados costos del tratamiento, aproximadamente 280.000 € anuales por paciente debido a la necesidad de repetidas y elevadas dosis. En este contexto, el desarrollo de nuevas alternativas con características mejoradas resulta de gran interés. La proteína PRX-102 es una variante producida en plantas, modificada químicamente con una molécula de PEG que permite la unión covalente de las dos subunidades que forman parte del homodímero; Kizhner y col. (2015)[11] reportaron que esta variante es equivalente a la enzima recombinante producida en células de mamíferos, con una vida media en circulación mejorada, así como mayor estabilidad en suero y lisosomas [135]. Sin

embargo, el empleo de PEG para incrementar la estabilidad, vida media en circulación, solubilidad o mejorar la farmacocinética y farmacodinamia de proteínas terapéuticas presenta ciertas desventajas, como la formación de anticuerpos anti-PEG, hipersensibilidad o incremento de formación de vacuolas en tejidos animales. Asimismo, el proceso de pegilación no es un evento sencillo, por el contrario, se deben considerar numerosos parámetros como el peso molecular y tamaño del PEG a utilizar, el número de moléculas de PEG unidos a la proteína y la posible localización de los sitios de interacción con la molécula. A su vez, al tratarse de una reacción química, el producto formado no es homogéneo, pudiendo generar isoformas con diferente grado de estabilidad y actividad [136, 137]. Otras estrategias propuestas se orientan a optimizar el proceso de producción global. La selección de un clon productor adecuado representa una de las principales tareas del desarrollo del proceso productivo. El clon AGA5.3 es el clon con mayor productividad descrito hasta el momento con las características fisicoquímicas adecuadas, con una productividad de rhGAL de $7,5 \text{ pg.cél}^{-1}.\text{día}^{-1}$ y una actividad enzimática de $1,3 \times 10^4 \text{ U.mg}^{-1}$ ($0,22 \text{ UI. mg}^{-1}$). Sohn y col. (2013) [105] reportaron valores de productividad de hasta 30 veces mayores que los valores alcanzados por el clon AGA5.3 en un biorreactor de fibra hueca. No obstante, el perfil de glicosilación de la enzima producida no resultó adecuado debido al desfase existente entre los elevados niveles de producción proteica y la baja capacidad celular de sialidación, debiendo realizarse una reacción enzimática *in vitro* posterior para lograr el perfil deseado. Esto último encarece el proceso de producción ya que impone realizar un paso adicional para lograr el producto final. La transfección transitoria de células HEK293 en suspensión ha sido propuesta como alternativa para la obtención de la enzima rhGAL [96], no logrando obtener niveles equivalentes en células CHO-K1 que, como se ha mencionado previamente, son las más utilizadas para la producción de proteínas recombinantes para uso terapéutico.

En este contexto, se planteó la hipótesis del presente trabajo de tesis, cuyo objetivo general es el desarrollo de un proceso de producción de la proteína rhGAL para uso terapéutico. Para tal fin, en primer lugar se optimizaron ensayos de cuantificación e identificación, empleando como molécula de referencia un lote del producto comercial (Fabrazyme®, *Agalsidase beta*, Genzyme) (E 2033 H 14).

En segundo lugar, se desarrollaron líneas y clones celulares recombinantes productores de rhGAL en células CHO-K1 utilizando vectores lentivirales de tercera generación. El empleo de vectores lentivirales permite incorporar un elevado número de copias del TG en el genoma celular a partir de múltiples rondas de transducción. Esto se traduce en un incremento de la productividad celular comparada con la

obtenida por métodos tradicionales de transfección debido a su capacidad de integrarse en regiones transcripcionalmente activas del genoma. Estas propiedades representan una ventaja respecto del empleo de otros sistemas de transferencia de material genético como el sistema plasmídico, que implica una integración aleatoria en el genoma celular y en un único sitio [40, 138]. Por tal motivo, se realizaron tres transducciones sucesivas de células CHO-K1 adherentes y en suspensión, empleando vectores lentivirales que contienen la secuencia codificante de rhGAL, a una multiplicidad de infección de 35 UT por célula. La línea CHO-K1 adherente seleccionada (CHO_{adh} GAL TD3 300) debió someterse a un proceso de adaptación a crecimiento en suspensión con el fin de facilitar el posterior escalamiento del cultivo y el desarrollo del proceso de purificación. No obstante, luego de 48 días de adaptación de su crecimiento en medio libre de suero, la productividad disminuyó 2,4 veces. Es por ello que se continuó trabajando con la línea en suspensión denominada CHO_s GAL TD3 50. Luego de realizar el clonado de la misma, se obtuvo un panel de 15 clones con productividades entre 3,5 y 59 pg.cél⁻¹.día⁻¹ y valores de actividad enzimática específica entre 3,1 x 10³ y 2,45 x 10⁴ U.mg⁻¹(0,05 a 0,4 UI.mg⁻¹). En tal sentido, se obtuvieron clones con valores de productividad específica de hasta 8 veces mayor y valores de actividad específica, en sobrenadante de cultivos, de 1,8 veces mayor que los valores reportados para el clon AGA5.3, que constituye la actual plataforma para la producción de uno de los medicamentos comerciales (Fabrazyme®). A su vez, es importante mencionar que el uso de esta plataforma no requiere el empleo de drogas tales como metotrexato o metionina sulfoximina, se reduce el número de clones a analizar y es posible realizar la transducción directamente en cultivos en suspensión. Todo esto en su conjunto reduce los tiempos y costos del proceso de generación de clones productores.

Cabe mencionar que en una primera instancia de la tesis se intentó obtener líneas y clones recombinantes mediante transfección con plásmidos, logrando productividades que no superaron los 2,5 pg.cél⁻¹.día⁻¹ y demandando un período de tiempo de aproximadamente 8 meses.

El clon seleccionado para la producción (P3G2) fue caracterizado en cuanto a su crecimiento y metabolismo. Se detectó la presencia de 2 copias del TG de interés, manteniendo elevados valores de expresión, similares a los exhibidos por la línea celular, que en promedio exhibió la inserción de 43 copias del TG en el genoma celular. Esto último permite pensar que las copias del TG en el clon P3G2 se encuentran insertadas en sitios transcripcionalmente activos y estables. Asimismo, no se identificaron copias de componentes derivados de LV en 1,0 x 10⁴ copias del genoma en la línea celular productora de rhGAL ni en el clon que deriva de ella.

El siguiente paso del trabajo consistió en desarrollar y poner a punto un protocolo de purificación que permitiera obtener la proteína pura y activa a partir de sobrenadantes de cultivo. Se realizaron dos pasos de purificación: un primer paso de captura empleando una resina de intercambio aniónico débil (*DEAE Sepharose Fast Flow*) y un segundo paso por interacción hidrofóbica (*Butyl Sepharose 4 Fast Flow*). Luego del segundo paso de purificación, se alcanzó una pureza del 98%, aproximadamente, y una recuperación del 60%. Tanto la molécula purificada a partir de sobrenadante de cultivo de la línea celular CHO_s GAL TD3 50 como del clon derivado de la misma presentaron propiedades fisicoquímicas y bioquímicas similares a las de la molécula comercial seleccionada como referencia Fabrazyme®. Asimismo, los valores de actividad específica determinados para ambas moléculas purificadas no presentaron diferencias significativas con los valores determinados para Fabrazyme®, pero sí entre ellas, siendo la actividad de rhaGAL-C alrededor de 2,5 veces mayor que la de rhaGAL-L. Esto último podría atribuirse a alguna diferencia en la distribución de glicanos cargados o bien en el perfil de isoformas de ambas moléculas. Según lo obtenido a partir del ensayo de HPLC-C4, la molécula rhaGAL-C, a diferencia de rhaGAL-L y Fabrazyme®, sólo presentó las formas incompletas de la proteína. Así, esto estaría de acuerdo con lo reportado por Miyamura y col. (1996) [130], quienes explican un aumento en actividad enzimática de hasta 6 veces luego de la remoción de 2 a 10 aminoácidos terminales. Por otro lado, ambas moléculas purificadas siguieron un comportamiento de tipo Michaelis-Menten, demostrando su capacidad de hidrolizar el sustrato sintético (4MU- α -Gal) a una velocidad comparable con la de Fabrazyme®. La composición estructural de las tres moléculas, determinada por espectroscopía de fluorescencia, demostró ser similar, no observándose diferencias en el perfil obtenido con ambas moléculas. Los tres espectros resultaron prácticamente superpuestos. Por el contrario, la molécula rhaGAL-L presentó la misma estabilidad que Fabrazyme® frente a proteasas séricas, siendo la misma superior en el caso de rhaGAL-C. Ésto no puede explicarse por diferencias en el contenido de ácido siálico, el cual demostró ser similar en ambas moléculas y superior a los valores determinados para Fabrazyme®, sino a que ambas moléculas presentaron diferencias en la relación ácido siálico:galactosa. La molécula rhaGAL-C presentó un menor contenido de residuos galactosa libre (siálico:Gal: 0,90) en comparación con rhaGAL línea (siálico:Gal: 0,81). Esta diferencia podría explicar la mayor estabilidad frente a proteasas, pudiendo ejercer un mayor efecto de impedimento estérico, bloqueando la acción de las proteasas, lo que a su vez se correlaciona con lo previamente reportado [139, 140].

En relación a la composición de monosacáridos, las tres moléculas presentaron similar contenido de Man, Gal y GlcNAc. El contenido de Fuc fue un 75% superior para rhaGAL-L con respecto al contenido de Fabrazyme®, mientras que los niveles determinados para la molécula rhaGAL-C no presentaron una diferencia significativa con respecto a los de Fabrazyme®. Esto podría indicar que las tres moléculas tienen similar distribución de glicanos de tipo complejo, alta manosa e híbridos. Sin embargo, para confirmar esta hipótesis, se debería realizar un análisis más exhaustivo mediante cromatografía líquida seguida de espectrometría de masa.

Para su aplicación como terapia de reemplazo enzimático es esencial que rhaGAL se dirija hacia los lisosomas de los tejidos afectados [82, 83, 105, 141]. La probabilidad de éxito de dirigirse a los tejidos blancos depende, fundamentalmente, de la presencia de residuos de M6P para promover la internalización por parte del receptor de M6P presente en los lisosomas, así como también de un elevado contenido de ácido siálico para aumentar la vida media en circulación. Como se mencionó previamente, el contenido de ácido siálico terminal es esencial para enmascarar los residuos de Gal, así aumentar la vida media en circulación de la proteína y asegurar la correcta distribución de la misma en los diferentes tejidos, ya que se reduce la internalización por los receptores de la asialoglicoproteína presente en el hígado. Asimismo, la carga y tamaño de la proteína reduce la filtración glomerular debido a que la pared capilar glomerular está cargada negativamente; cuanto mayor es la carga negativa y el tamaño de la proteína, mayor efecto de repulsión de cargas e impedimento estérico y, por lo tanto, menor velocidad de filtración [142, 143]. El contenido de M6P de ambas proteínas purificadas fue similar al valor determinado para la molécula de referencia. Por otro lado, el contenido de ácido siálico Neu5Ac para rhaGAL-L y rhaGAL-C resultó aproximadamente un 50% mayor, que lo reportado para la molécula de referencia. Asimismo, como se mencionó previamente, ambas moléculas presentaron una mayor relación siálico:galactosa que la molécula de referencia. Estos valores se correlacionan con lo obtenido mediante la técnica WAX-HPLC, mediante la cual se logró identificar un mayor contenido de *N*-glicanos cargados con respecto a los neutros para rhaGAL-L y rhaGAL-C.

El mayor contenido de Neu5Ac, permite presuponer que mostrará mayor vida media en circulación y adecuada distribución en los diferentes tejidos, lo que probablemente reduciría la dosis y frecuencia de administración de la enzima. Esto último deberá confirmarse mediante futuros ensayos *in vivo*.

Finalmente, se determinó que la incubación de las moléculas recombinantes rhaGAL-L y rhaGAL-C produjeron un aumento de la actividad enzimática específica tanto en células HEK293T/17 como en fibroblastos de pacientes con la enfermedad de

Fabry. Este resultado preliminar resultó alentador a los fines de considerar dichas moléculas como candidatos para una terapia de reemplazo. Además, se confirmó la internalización y localización subcelular de las enzimas mediante microscopía de inmunofluorescencia, presentando un patrón granular característico de localización en lisosomas. Luego de 24 h postadministración de la enzima en sobrenadante de cultivos de células HEK293T/17, la actividad específica se vio aumentada, siendo mayor en el caso de Fabrazyme®, luego $\rho\alpha$ GAL-L y $\rho\alpha$ GAL-C, respectivamente. La actividad específica asociada a los lisados celulares de fibroblastos fue menor que la obtenida para células HEK293T/17. Esta diferencia podría estar asociada a una variación de la densidad de receptores de M6P en membrana plasmática para cada tipo celular. Asimismo, luego de analizar los lisados de fibroblastos humanos, $\rho\alpha$ GAL-L presentó un mayor valor de actividad específica ($p < ,05$), siendo muy similares los valores obtenidos para $\rho\alpha$ GAL-C o Fabrazyme®. Si bien la molécula $\rho\alpha$ GAL-C exhibió un mayor valor de actividad enzimática *in vitro*, el menor valor de actividad específica asociada a los lisados celulares podría deberse a un efecto de impedimento estérico dado por las moléculas de ácido siálico y su distribución, enmascarando los residuos M6P e impidiendo su interacción con los receptores de M6P, presentes en membrana plasmática. Asimismo, a pesar de medir igual contenido de residuos de M6P por mol de enzima en las tres moléculas empleando el sistema HPAEC-PAD, mediante el ensayo WAX-HPLC se logró determinar menos isoformas mono-fosforiladas en la molécula $\rho\alpha$ GAL-C, lo que también podría influenciar en la eficiencia de captación de esta variante por los receptores de M6P. No obstante, todos estos resultados *in vitro* no indican necesariamente lo que ocurrirá *in vivo*, ya que no tienen en cuenta las diferencias farmacocinéticas entre las enzimas, ni en su distribución corporal o en su metabolismo.

Está descripto que a las 24 h postadministración de la enzima se obtiene la mayor actividad [86]. Sin embargo, como se evidencia en este trabajo, existe un porcentaje elevado que no es internalizado, lo que puede explicarse por una saturación de los receptores de M6P presentes en membrana plasmática. A su vez, el mecanismo de endocitosis y localización de la enzima es un evento dinámico bajo la condición de administración continua, lo que hace suponer que a las 24 h postratamiento parte de la enzima ha sido correctamente internalizada, a medida que otra proporción está siendo internalizada y otra, ya en el interior celular, que “se escapa” de la vía lisosomal y se dirige hacia el exterior.

Los resultados discutidos aquí, entonces, permiten proponer esta plataforma de producción como una alternativa para la obtención del biofármaco necesario para el tratamiento de la enfermedad de Fabry. En términos generales, se obtuvieron clones

con un balance apropiado entre una elevada productividad y una adecuada calidad de la enzima. Asimismo, se aumentó la eficiencia de transferencia génica, reduciendo los tiempos requeridos para obtener una línea celular productora. Cabe destacar que se logró obtener líneas celulares adaptadas a crecer en medios libres de suero, un componente cuyo uso es controvertido desde el punto de vista regulatorio, reduciendo aún más los costos del proceso de producción. A su vez, se optimizó un protocolo de purificación a partir de sobrenadantes de cultivo, que permitió purificar la enzima a partir de sobrenadantes de una línea celular recombinante y a partir de sobrenadantes de un clon derivado de la misma. Ambas moléculas caracterizadas presentaron propiedades fisicoquímicas y bioquímicas similares a una de las variantes utilizadas en la TRE para la enfermedad de Fabry (Fabrazyme®). Además, ambas moléculas mostraron propiedades mejoradas con respecto al perfil de glicosilación, en particular, un elevado contenido del ácido siálico Neu5Ac y un menor contenido de la variante inmunogénica Neu5Gc. En relación a las características distintivas entre ellas, la molécula rhαGAL-C presentó una mayor estabilidad en plasma y mayor actividad específica *in vitro* en comparación con rhαGAL-L y Fabrazyme®, mientras que rhαGAL-L exhibió un mayor grado de internalización en células HEK293T/17 y en fibroblastos de pacientes con la enfermedad de Fabry, evidenciado por una mayor actividad específica en ensayos *in vitro*. Es así que, para elegir el mejor candidato terapéutico sería necesario evaluar su farmacocinética y actividad biológica en modelos *in vivo*. Sin embargo, para estandarizar el proceso de producción se requiere el empleo de un clon celular, ya que se considera que la robustez y la estabilidad del proceso dependen también de la monoclonalidad de las células productoras [144]. Por lo tanto, una vez realizado los ensayos *in vivo* y en el caso que la molécula rhαGAL-L presente mejores características que rhαGAL-C, se deberá buscar un nuevo clon que presente las mismas características que la molécula aislada a partir de la línea productora.

En conclusión, todos los resultados obtenidos demuestran que el bioproceso desarrollado representa una alternativa muy interesante para la producción de la enzima alfa Galactosidasa A recombinante para uso terapéutico.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Plan de Inmunización

Con el objetivo de obtener pAb (anticuerpo policlonal) anti-rhGAL se inmunizó un conejo con 50 µg de la molécula de referencia Fabrazyme®. Las inoculaciones se realizaron empleando la vía subcutánea en la región dorsal del animal. Se utilizó la metodología de inoculación multisitio inyectado aproximadamente 1 ml de la mezcla en 10 sitios diferentes de dicha región. Se realizó una primera inmunización preparando una emulsión con el adyuvante completo de Freund, seguido de dos inmunizaciones adicionales empleando el adyuvante incompleto de Freund. A los 7 y 14 días posteriores de la última inmunización se realizó la extracción del suero; se evaluó, mediante la técnica ELISA específico indirecto, el título de anticuerpos de cada extracción y del pool de anticuerpos, generado a partir de ambas sangrías.

El protocolo de ELISA específico indirecto se describe a continuación:

Sensibilización: sensibilizar placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano (Greiner Bio-One, Alemania) con un volumen de 100 µl.pozo⁻¹ de Fabrazyme® (100 ng.pozo⁻¹) diluido en solución de Na₂CO₃/NaHCO₃ 50 mM, pH 9,6 (solución de sensibilización), durante 1 h a 37°C y luego 16 h a 4°C.

Bloqueo: realizar el bloqueo de los sitios de interacción inespecífica con 200 µl.pozo⁻¹ de solución de ASB (Sigma-Aldrich) 1% (p/v) en PBS (solución de bloqueo). Incubar durante 1 h a 37°C.

Primera incubación: agregar 100 µl de diluciones sucesivas 1/2 de las muestras pura o diluidas, según corresponda, en solución de ASB 0,1% (p/v) en PBS con el agregado de Tween 20 (USB Corporation, USA) 0,05% (v/v) (solución diluyente). Incubar durante 1 h a 37°C.

Segunda incubación: colocar 100 µl.pozo⁻¹ de solución de anticuerpo P0448 anti-*rabbit* conjugado a Horseradish peroxidase (HRP) (Dako, USA) en una dilución 1/2.000. Incubar 1 h a 37°C.

Revelado: revelar mediante reacción enzimática empleando como sustrato H₂O₂ 0,015 volúmenes diluida en solución de citrato/fosfato de sodio 50 mM (pH 5,3), con el agregado de o-fenilendiamina (OPD, Sigma-Aldrich) en una concentración de 0,5 mg.ml⁻¹ (solución de revelado). Agregar 100 µl de solución de revelado por pozo y, luego de 15 min de incubación en oscuridad a temperatura ambiente, detener la reacción mediante el agregado de 50 µl.pozo⁻¹ de H₂SO₄ (Cicarelli, Argentina) 2 N. Efectuar lectura a λ= 492 nm en lector de placas Multiskan (Thermo Fisher Scientific, USA).

Controles: se realizaron dos controles:

- a) Control negativo: se utiliza suero de conejo no inmunizado.
- b) Control sin sensibilizar: para evaluar posible reconocimiento inespecífico de los anticuerpos presentes en suero.

Realizar todas las incubaciones en cámara húmeda. Después de cada etapa, realizar seis lavados con solución de PBS-Tween 20 0,05% (v/v) (solución de lavado).

2. Desarrollo de un método de cuantificación de rhaGAL por ELISA sándwich

2.1. Purificación de pAb anti-rhaGAL mediante cromatografía de afinidad a proteína A

Se realizó la purificación de anticuerpos policlonales anti-rhaGAL empleando 7 ml de una resina de proteína A Sepharose (MAbSelect Sure, GE Healthcare, UK) empaquetada en una columna XK 16/20 de 1,6 x 2,48 cm, conectada a un ÄKTAexplorer 100 Air (GE Healthcare).

Antes de comenzar el protocolo de purificación, se llevó a cabo el acondicionamiento de la muestra con el fin de lograr la interacción apropiada entre la porción Fc del anticuerpo y la proteína A. El suero se ajustó a una concentración de NaCl 3 M, pH 9,0 mediante el agregado de NaCl sólido y solución de Tris 1 M pH 9,0 en una proporción volumétrica 10:1. Finalmente, la muestra se centrifugó por 5 min a 5.000 rpm y luego se clarificó con filtro de membrana (PVDF, difluoruro de polivinilo, Millipore, Francia) de 0,45 μm .

El protocolo desarrollado para la purificación mediante cromatografía de inmunoafinidad se describe a continuación:

Equilibrado: equilibrar la matriz con 10 VC (volumen de columna) de solución de equilibrado (NaCl 0,5 M Tris-HCl 20 mM pH 9,0) a un flujo de 0,7 ml.min⁻¹.

Siembra: sembrar un volumen de muestra acondicionada, a un flujo aproximado de 0,7 ml.min⁻¹. Recolectar el FT para su posterior análisis.

Lavado 1: lavar la matriz con 5 VC de una solución de equilibrado.

Elución por descenso de pH: aplicar 10 VC de una solución de cítrico/citrato 0,1 M pH 3,0 al mismo flujo utilizado durante la etapa de equilibrado. Recolectar las fracciones, y neutralizarlas con solución tampón fosfato de sodio 1 M pH 7,0. Conservar a - 20°C para su posterior análisis.

Lavado 2: lavar con 5 VC de una solución tampón de fosfato de sodio 20 mM pH 7,0.

Lavado 3: lavar con 5 VC de una solución de Tritón X-100 0,1% v/v.

Lavado 4: realizar un último lavado con 10 VC, empleando una solución tampón de fosfato de sodio 20 mM pH 7,0.

Conservación de la matriz: lavar con solución de conservación (etanol 20% v/v, fosfato de sodio 20 mM pH 7,0) y se guardó a 4°C hasta su reutilización.

El flujo aplicado durante las etapas de los lavados fue igual al empleado durante la fase de equilibrado.

Finalizado el proceso cromatográfico, se mezclaron las fracciones correspondientes al pico de elución, las cuales fueron monitoreadas por lectura de absorbancia a $\lambda = 280$ nm. Parte del volumen obtenido fue dializado contra solución de PBS con el objeto de acondicionar los anticuerpos para el ensayo de cuantificación por ELISA, mientras que otra parte del volumen fue dializado contra solución tampón bórico/borato 0,1 M pH 8,8 (solución de diálisis) para la conjugación del anticuerpo a biotina.

2.1.1. Evaluación del proceso de purificación

La concentración del anticuerpo policlonal purificado fue calculada mediante lectura espectrofotométrica a $\lambda = 280$ nm empleando como blanco de lectura la solución de diálisis. Para esto, se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de Ig (mg.ml}^{-1}\text{)} = (\text{Amuestra} - \text{Ablanco})_{280\text{nm}} \times 0,8 \quad (8)$$

La pureza del anticuerpo se evaluó mediante SDS-PAGE con posterior coloración con azul brillante de *Coomassie*, como se explica en el apartado 4.1.1 de esta sección.

2.2. Conjugación de anticuerpos policlonales

Se preparó una solución de 10 mg.ml⁻¹ de Biotinyl-*N*-hydroxysuccinimide ester (Sigma-Aldrich) en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich).

En primer lugar, se realizó una dilución del pool de anticuerpos purificados. Luego, se dispensaron 1,6 ml de solución de anticuerpos de 3,85 mg.ml⁻¹ (pAb anti-rhGAL) (6 mg totales) y 60 μ l de solución de Biotinyl-*N*-hydroxysuccinimide ester preparada en DMSO. Se incubó por 4 h, en agitación a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, se inhibió la reacción de conjugación mediante el agregado de solución de NH₄Cl 1M. Finalmente, se dializó contra solución salina de fosfatos PBS durante 24 horas. La concentración del pAb biotinilado fue calculada

mediante lectura espectrofotométrica a $\lambda = 280$ nm empleando como blanco de lectura la solución de diálisis. Asimismo, se midió la eficiencia de conjugación mediante técnica de ELISA específico indirecto, como se explicó anteriormente.

2.3. ELISA sándwich

Este ensayo consistente en la captura de la rhaGAL por anticuerpos policlonales de conejo inmovilizados sobre placas de poliestireno. Luego, la molécula rhaGAL es reconocida por los anticuerpos policlonales de conejo conjugados con biotina, cuya presencia se revela por incubación con estreptavidina conjugada con la enzima peroxidasa, que a posteriori catalizará la transformación de un sustrato incoloro en una sustancia coloreada.

El protocolo de ELISA desarrollado se describe a continuación:

Sensibilización: sensibilizar placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano (Greiner Bio-One) con un volumen de $100 \mu\text{l.pozo}^{-1}$ de solución de anticuerpo pAb anti- rhaGAL $3,76 \text{ mg.ml}^{-1}$ en PBS (100 ng.pozo^{-1}) diluido en solución sensibilización, durante 1 h a 37°C y luego 16 h a 4°C .

Bloqueo: bloquear los sitios de interacción inespecífica con $200 \mu\text{l.pozo}^{-1}$ de solución de bloqueo durante 1 h a 37°C .

Primera incubación: adicionar $100 \mu\text{l}$ de diluciones sucesivas 1/2 de la solución estándar Fabrazyme® desde 50 ng.ml^{-1} , o la dilución correspondiente de las muestras a analizar, en solución diluyente. Incubar durante 1 h a 37°C .

Segunda incubación: colocar $100 \mu\text{l.pozo}^{-1}$ de solución de anticuerpo pAb a- rhaGAL biot, diluido 1/800. Incubar 1 h a 37°C .

Tercera incubación: colocar $100 \mu\text{l.pozo}^{-1}$ de solución de anticuerpo conjugado a streptavidina-peroxidasa (AMDEX, GE Healthcare) diluido 1/10.000. Incubar 1 h a 37°C .

Revelado: realizar el mismo procedimiento que en el caso del ensayo ELISA específico indirecto.

Controles: se realizaron dos controles:

- a) Control negativo: sin anticuerpo soluble, para evaluar posible unión inespecífica de los reactivos. Para ello, durante la primera incubación, se reemplazó el Ag por el agregado de $100 \mu\text{l}$ de solución diluyente y se continuó con las siguientes etapas del ensayo.
- b) Control sin sensibilizar (sin anticuerpo de captura): para evaluar posible reconocimiento inespecífico de los anticuerpos presentes en suero.

Llevar a cabo todas las incubaciones en cámara húmeda. Después de cada etapa, realizar seis lavados con solución de lavado.

3. Medición de actividad enzimática *in vitro*

La actividad enzimática *in vitro* de la rhGAL se determinó mediante hidrólisis del sustrato artificial 4-metilumbeliferil- α -D-galactopiranosido (4-MU- α -Gal, Sigma-Aldrich). La reacción se llevó a cabo en solución tampón citrato de sodio 0,1 M pH 4,7 a 37°C durante 45 min, adicionando 0,02 ml de la dilución correspondiente de la muestra a analizar en volumen final de 0,06 ml. La reacción se detuvo mediante el agregado de 0,24 ml de solución tampón glicina 0,15 M pH 10,4.

El producto liberado (4-metilumbeliferona, 4-MU) se determinó por lectura de la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 355 nm y una longitud de onda de emisión de 450 nm. Los valores de Intensidad de fluorescencia se expresan como concentración de 4-MU a partir de la curva de calibrado de 4-MU estándar. El rango lineal de trabajo fue establecido entre $1,9 \times 10^{-3}$ y 6×10^{-3} mM de 4-MU.

Se define como una unidad de actividad enzimática (U) a la cantidad de enzima que libera 1 nmol de 4-MU por hora [97]. De igual manera, un UI se define como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de 4-MU por minuto.

3.1. Curva de adición estándar 4-MU

Para la determinación de la actividad enzimática *in vitro* en muestras que contienen la enzima rhGAL en sobrenadantes de cultivo condicionado por células CHO-K1s, se utilizó el método de adición estándar. Para ello se tomaron 0,05 ml de muestra problema (sobrenadante de cultivos CHO-K1s *wt*) y se prepararon cinco estándares por adición sucesivas de diversas cantidades de 4-MU en un volumen final 0,15 ml. De esta manera, la muestra problema se adicionó en iguales proporciones a las empleadas en el ensayo de actividad enzimática *in vitro* propiamente dicho. Se tienen las siguientes disoluciones:

| Muestras |
|---|
| Muestra problema |
| Muestra problema + $5,8 \times 10^{-4}$ mM 4-MU |
| Muestra problema + $1,4 \times 10^{-3}$ mM 4-MU |
| Muestra problema + $2,8 \times 10^{-3}$ mM 4-MU |
| Muestra problema + $4,3 \times 10^{-3}$ mM 4-MU |

4. Desarrollo de ensayos de identificación

4.1. Inmunocaracterización mediante SDS-PAGE

La masa molecular aparente y el patrón de isoformas de r hαGAL fueron evaluados mediante ensayos de SDS-PAGE. Esta metodología permite llevar a cabo la separación electroforética de las proteínas. Posteriormente, la detección se realizó de manera diferente según se tratase de una muestra pura o impura (como es el caso de los sobrenadantes de cultivo) y de su concentración. Para evaluar el grado de pureza obtenido luego de cada paso de purificación, la detección se realizó mediante tinción de las proteínas utilizando el colorante azul brillante de *Coomasie*. Para las muestras correspondientes a sobrenadantes de cultivo se llevó a cabo un ensayo de *western blot* mediante la electrotransferencia de las proteínas a una membrana de PVDF e identificación de las moléculas transferidas por interacción con anticuerpos específicos.

Para el armado de los geles se utilizó el sistema de electroforesis modular vertical Mini-Protean 3 (Bio-Rad, USA). Todos los geles fueron realizados en condiciones desnaturalizantes, agregando el detergente iónico dodecil sulfato de sodio (SDS). Para ello, se utilizó un gel de apilamiento con una concentración de acrilamida/bisacrilamida del 5% (p/v) y un gel de separación con una concentración de acrilamida/bisacrilamida del 12% (p/v). Todas las muestras se prepararon con una solución de Tris-HCl 50 mM, SDS 2% (p/v), glicerol 10% (v/v), azul de bromofenol 0,05% (p/v), pH 6,8 (solución de siembra) en proporción 3:1. En el caso de emplear el marcador de masa molecular *Unstained*, SDS-PAGE, *Broad Range* 0317 (Bio-Rad), el mismo se preparó con solución de siembra y 2-ME 5%(v/v). Para los otros dos marcadores de masa molecular (Dual Color 0374, *Prestained Broad Range* 0318, Bio-Rad) no fue necesario realizar este tratamiento, ya que los mismos se presentan previamente coloreados. La corrida electroforética se llevó a cabo empleando solución de corrida (Tris 25 mM, glicina 0,2 M; SDS 0,1% (v/v)), a un voltaje constante de 200 V, sumergiendo el módulo en baño de hielo. La corrida finalizó cuando el frente de corrida alcanzó 0,5 cm del borde inferior del gel de separación.

4.1.1. Detección mediante coloración con azul brillante de *Coomasie*

Para el análisis de las muestras purificadas, el gel se sumergió durante 10 min en solución de coloración (azul brillante *Coomasie* R-250 0,1% (p/v) en metanol 40% (v/v) y ácido acético 10% (v/v)). Posteriormente, se decoloró con solución de metanol 7,5% (v/v) y ácido acético 5% (v/v) hasta aparición de bandas nítidas y disminución

de la tinción de fondo. Este protocolo permitió no sólo evaluar la masa molecular aparente, sino también evaluar el grado de pureza de las muestras purificadas. Para ello, una vez identificadas las impurezas de la muestra, se realizó una densitometría de las bandas coloreadas empleando un escáner para densitometría (Image Scanner, GE Healthcare) y el *software* Image Master Total Lab V1.11 (GE Healthcare).

4.1.2. Detección inmunoquímica (western blot)

Para analizar muestras correspondientes a sobrenadantes de cultivo, luego de la electroforesis se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF (Bio-Rad), empleando el mismo equipo de Bio-Rad (transferencia sumergida). Se utilizó un protocolo estándar de transferencia de proteínas, empleando como solución de transferencia Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8,3, metanol 20% (v/v), a intensidad de corriente constante de 180 mA durante 1 h, refrigerando el dispositivo en todo momento. Posteriormente, se llevó a cabo la detección inmunoquímica como se describe a continuación:

Bloqueo: bloquear los sitios de la membrana de PVDF sin proteínas adsorbidas por inmersión de la misma en solución de leche descremada 5% (p/v) en solución tampón TBS (Tris-HCl 50 mM; NaCl 150 mM; pH 7,5) con el agregado de Tween 20 al 0,05% (v/v). Incubar durante 1 h a temperatura ambiente con agitación.

Primera incubación: incubar la membrana de PVDF con una solución de anticuerpo policlonal de conejo anti- r α GAL en una dilución 1/2.000 preparada con solución diluyente de *western blot* (leche descremada 0,5% (p/v) en TBS-Tween 20 al 0,05% (v/v)). Incubar durante 1 h a temperatura ambiente con agitación.

Segunda incubación: incubar la membrana con anticuerpo P0448 anti-*rabbit* conjugado a Horseradish peroxidase (HRP) (Dako, USA) en una dilución 1/2.000 en solución diluyente de *western blot*. Incubar durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación.

Revelado: emplear el *kit* de quimioluminiscencia Quimioluminisce SuperSignal®West (Pierce™ ECL *Western Blotting substrate*, Thermo Fisher Scientific), siguiendo las indicaciones del fabricante. Incubar la membrana con el reactivo durante 1 min a temperatura ambiente, escurrir y colocar en un soporte de acrílico cubriéndola con un nylon para evitar el contacto del sustrato con la película reveladora. Finalmente, exponer la membrana a una

película fotográfica Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare) en un cuarto oscuro durante 1,5-2 min. Efectuar el revelado de la película fotográfica en forma manual empleando el método convencional de revelado y fijación (Reforzador y Fijador GBX, Kodak).

Luego de cada etapa, realizar tres lavados, los cuales consisten en sumergir la membrana de PVDF en solución de TBS-Tween 20 al 0,05% (v/v) durante 5 min con agitación.

4.2. Isoelectroenfoque (IEF)

El análisis de las isoformas de diferente punto pI se realizó mediante focalización isoeléctrica, utilizando un sistema de GE Healthcare compuesto por una cuba de electroforesis (Multiphor II), un baño refrigerante (Multitemp III) y una fuente de poder (EPS3500XL). Esta metodología fue empleada para evaluar muestras purificadas y muestras correspondientes a sobrenadantes de cultivo, es por esto que, al igual que para la metodología anterior, la detección se realizó de acuerdo a las características de las muestras analizadas.

La técnica de isoelectroenfoque se llevó a cabo en geles de 1 mm de espesor, de una concentración de acrilamida/bisacrilamida del 8% (p/v), con el agregado de urea 8 M. Se trabajó con dos rangos de pH: el primero de 3,0-10,0 (*Ampholyte high resolution* pH 3,0- 10,0, 40% (v/v) en agua, Sigma-Aldrich) y el segundo rango entre 3,5 y 5,5. Éste último se obtuvo mediante la mezcla de un 75% (v/v) de anfolitos pH 3,0–5,0 (*Ampholyte high resolution* pH 3,0- 5,0, 40% (v/v) en agua, Sigma-Aldrich) y un 25% (v/v) de anfolitos pH 5,0–7,0 (*Ampholyte high resolution* pH 5,0- 7,0, 40% (v/v) en agua, Sigma-Aldrich). Una vez preparado el soporte electroforético, se realizó el pre-enfocado de los anfolitos durante 30 min a 30 W, 250 V y 50 mA con el fin de generar el gradiente de pH. Posteriormente, se sembraron 20 µl de las muestras a una distancia de 1 cm desde el cátodo. El enfocado se realizó durante 90 min, empleando las mismas condiciones indicadas en la etapa de pre-enfocado. Es importante tener en cuenta que para muestras correspondientes a sobrenadantes de cultivo previamente se llevó a cabo el desalado, concentración y diafiltración de las mismas con agua Milli Q. Para ello, se utilizó una membrana de ultrafiltración de 10 KDa, Amicon® Ultra-4 (Millipore, Francia).

4.2.1. Detección mediante coloración con azul brillante de Coomasie coloidal

Cuando el procedimiento de IEF se llevó a cabo sembrando muestras puras, el gel fue sometido a coloración empleando azul brillante de *Coomasie* coloidal, el cual se incubó durante 30 min. Posteriormente se procedió a lavar el gel con agua destilada para retirar el exceso de colorante.

4.2.2. Detección inmunoquímica (western blot)

Cuando el procedimiento de IEF se llevó a cabo sembrando muestras impuras y al igual que lo descrito para la metodología de SDS-PAGE, los componentes separados fueron transferidos a membranas de PVDF, utilizando la unidad de transferencia electroforética horizontal Multiphor II Nova Blot (GE Healthcare). La transferencia se llevó a cabo durante 1 h a 2000 V, 10 W y una intensidad de corriente de 150 mA, empleando la misma solución de transferencia utilizada en los ensayos de *western blot* (sección 4.1.2). La detección inmunoquímica de las isoformas de las moléculas transferidas a las membranas se realizó siguiendo el protocolo descrito para los ensayos de *western blot*.

5. Técnicas de biología molecular

5.1. Líneas celulares procariotas

E. coli TOP 10 (Invitrogen). Se empleó para el aislamiento y la amplificación de diferentes plásmidos.

5.2. Medios de cultivo para células procariotas

La esterilización de los medios de cultivo para bacterias se realizó en autoclave durante 15 min a 1 atmósfera y 120°C. A continuación se detallan los medios de cultivo empleados:

a) Medio LB (Luria Bertani)

| | |
|----------------------|---------------------------------------|
| Triptona | 10 g.l ⁻¹ (Sigma-Aldrich). |
| Extracto de levadura | 5 g.l ⁻¹ (BD, USA). |
| NaCl | 10 g.l ⁻¹ (Sigma-Aldrich). |
| pH | 7,2 |

b) Medio LB-Antibiótico

Medio LB.

Antibiótico: ampicilina 100 µg.ml⁻¹ (Bagó, Argentina).

c) *Agar LB*

Medio LB.

Agar al 2% (P/V) (Sigma-Aldrich).

d) *Agar LB-Antibiótico*

Agar LB

Antibiótico: ampicilina 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Bagó).

5.3. *Purificación de ADN plasmídico*

Los plásmidos fueron purificados a partir de cultivos de bacterias transformadas en medio líquido (Medio LB-Antibiótico). Todos los métodos de purificación se basan en el tamaño relativamente pequeño de los plásmidos y su naturaleza circular cerrada covalentemente.

5.3.1. *Minipreparación de ADN plasmídico*

Se utilizó el *kit* comercial *Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system* (Promega, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante, como se describe a continuación:

1. A partir de colonias individuales de cultivos en medio Agar-LB-Antibiótico inocular frascos conteniendo 10 ml de medio LB-Antibiótico y cultivar durante 16-20 h con agitación a 180 rpm y a 37°C.
2. Centrifugar a 2.500 *g* durante 10 min 1,5 ml del cultivo en un tubo Eppendorf. Descartar el sobrenadante y repetir este procedimiento con otros 1,5 ml de cultivo.
3. Resuspender el *pellet* celular con 250 μl de Solución de Resuspensión y adicionar 250 μl de Solución de Lisis Celular. Invertir el tubo 4 veces.
4. Inmediatamente, adicionar 10 μl de solución de proteasa alcalina, invirtiendo el tubo 4 veces e incubando a temperatura ambiente 5 min.
5. Agregar 350 μl de Solución de Neutralización e invertir el tubo varias veces. Centrifugar a 5.000 *g* por 10 min.
6. Tomar el sobrenadante (aproximadamente 850 μl) y transferir a una columna de purificación, colocada dentro de un tubo colector. Centrifugar a 5.000 *g* durante 1 min y descartar el FT.
7. Agregar a la columna 750 μl de Solución de Lavado, centrifugar 1 min a 5000 *g* y repetir el lavado con 250 μl , centrifugando 2 min.
8. Posteriormente, transferir la columna de purificación a un tubo Eppendorf nuevo y eluir el ADN plasmídico agregando sobre la resina de la columna

100 μ l de agua Milli Q autoclavada. Dejar reposar un momento y centrifugar 1 min a 5.000 *g*.

Por último, se evaluó la integridad de los plásmidos mediante electroforesis en gel de agarosa, como se explica en el apartado 5.6 de esta sección.

5.3.2. Maxipreparación de ADN plasmídico

Con el propósito de obtener cantidades suficientes de los vectores de expresión para su empleo en experimentos de ensamblado de partículas lentivirales, se realizaron preparaciones de ADN plasmídico en gran escala (maxiprep), tal como se describe a continuación:

1. Inocular 10 ml de medio de cultivo LB-Antibiótico con una colonia proveniente de medio LB-Agar-Antibiótico e incubar a 37°C a 180 rpm durante 16 h.
2. Adicionar a este precultivo 90 ml de LB-Antibiótico y cultivar durante otras 8 h en las mismas condiciones.
3. Inocular con este precultivo 200 ml de LB-Antibiótico y cultivar durante 16-20 h adicionales en las mismas condiciones.
4. Centrifugar los cultivos a 2.500 *g* durante 10 min a 4°C.
5. Resuspender el *pellet* en 10 ml de TEG estéril (Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM; glucosa 1% (p/v), pH 8,3), transferir la suspensión celular a un tubo cónico de 50 ml y mantener en hielo durante 5 min.
6. Agregar 20 ml de NaOH 0,2 M, SDS 1% (p/v), y homogeneizar adecuadamente para lograr la lisis celular en hielo durante 5 min.
7. Adicionar 15 ml de acetato de potasio 5 M (pH 5,2) a 4°C (Solución de Neutralización), homogeneizar e incubar en hielo durante 10 min.
8. Centrifugar 10 min a 4°C a 2.500 *g*.
9. Filtrar el sobrenadante con papel de filtro, en tubos cónicos de 50 ml. Precipitar con 0,6 volúmenes de isopropanol (Baker, USA), incubando 15 min a -70°C.
10. Centrifugar 20 min a 2500 *g*, a 4°C y eliminar el sobrenadante.
11. Resuspender el *pellet* en 1 ml de etanol 80% (v/v) en TN (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0) transferir a un tubo Eppendorf. Centrifuga 1 min a 13.000 *g*.
12. Disolver el *pellet* obtenido en 1 ml de LiCl 2 M con el propósito de precipitar el ARN. Mantener en hielo por 60 min.

13. Centrifugar la solución obtenida por 2 min a 13.000 *g* y transferir el sobrenadante a dos tubos Eppendorf nuevos (mitad de sobrenadante a cada tubo).
14. Agregar 250 μl de fenol y luego 250 μl de cloroformo a cada tubo, agitar y centrifugar la mezcla 2 min a 13.000 *g*. Tomar la fase acuosa superior de ambos tubos y juntar en un único tubo.
15. Precipitar con 1 volumen de isopropanol, agitar y mantener 15 min a -70°C . Centrifugar 15 min a 4°C a 13.000 *g* y lavar el *pellet* con 50 μl de etanol 80% (v/v) en TN, centrifugando 5 min.
16. Disolver el *pellet* en 500 μl de TE (Tris-HCl 25 mM, NaCl 100 mM, pH 8,3) 0,5 X conteniendo 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de RNAsa A (Promega) e incubar 60 min a 37°C , para eliminar restos de ARN.
17. Repetir paso 14.
18. Agregar a la fase acuosa 50 μl de NaAc 3 M (pH 7,0) y 900 μl de isopropanol. Agitar e incubar 15 min a -70°C , de modo de precipitar el ADN plasmídico. Centrifugar 15 min a 13.000 *g* a 4°C y el *pellet* generado con 50 μl de etanol 80% (v/v) en TN.
19. Dejar secar a 37°C en baño seco termostatzado.
20. Disolver el *pellet* en 300 μl de agua Milli Q estéril determinar la concentración y pureza del ADN plasmídico obtenido.

5.4. Determinación de la concentración y pureza del ADN

Los ácidos nucleicos absorben luz ultravioleta debido a la presencia de bases aromáticas nitrogenadas a lo largo de las cadenas del ADN. Ésta es una característica propia de la molécula, que presenta un máximo de absorción a una longitud de onda de 260 nm. A esta longitud de onda la absorción es proporcional a su concentración. Una unidad de absorbancia a $\lambda = 260$ nm equivale a una concentración de $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de ADN doble cadena (ADNdc).

De esta manera, la concentración y pureza de los plásmidos se determinó por medida de su absorbancia a $\lambda = 260$ nm y $\lambda = 280$ nm en espectrofotómetro UV-visible (Ultrospec 2000), según las siguientes ecuaciones:

$$\text{Concentración de ADN} (\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}) = DO(260 \text{ nm}) \times 50 \frac{\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}\text{ADN}}{DO} \times \frac{1}{\text{Dilución}} \quad (9)$$

$$\text{Pureza de la muestra} = \frac{DO(260 \text{ nm})}{DO(280 \text{ nm})} \quad (10)$$

El valor de pureza debe estar comprendido en el rango entre 1,8 y 2,0. Por fuera del mismo, la solución no es considerada apta para su uso en transfección/transducción de células eucariotas, ya que posee una cantidad considerable de contaminantes (proteínas, reactivos utilizados en la extracción, entre otros) que podrían afectar la eficiencia de la misma.

5.5. Digestiones enzimáticas

Las digestiones con endonucleasas de restricción (Promega) se realizaron respetando los medios y condiciones recomendados por el fabricante. En todos los casos, la reacción se llevó a cabo durante 2 h a 37°C, empleándose de 1 a 5 U de enzima por cada μg de ADN, en un volumen final de 20 μl . Luego de las digestiones enzimáticas, los fragmentos se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa para su posterior análisis y/o purificación.

5.6. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Las separaciones de ADN en geles de agarosa se realizaron empleando el sistema submarino. Para la preparación de los geles, de concentración de agarosa variable entre 1% y 1,5% (p/v), se pesó la cantidad adecuada de agarosa (Biodynamics SRL, Argentina) y se disolvió en solución tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, Na_2EDTA 1mM pH 8,0) en horno microondas hasta su completa solubilización. La solución se enfrió a 60°C y se adicionó el colorante *SYBR® Safe DNA gel stain* (Invitrogen, USA) en una dilución 1/10.000. Esta solución se colocó en un soporte adecuado y se le introdujo un peine de 1 mm de espesor para formar los carriles de siembra, el cual se retiró una vez solidificado. El gel se colocó en una cuba electroforética y se cubrió completamente con solución TAE.

Las muestras de ADN se mezclaron con solución de siembra 6X (Ficoll 400 10% (p/v), azul de bromofenol 0,25% (p/v), Na_2EDTA 50 mM, Tris 10 M pH 7,5) y se sembraron en cada una de las calles del gel. Se tapó la cuba y se aplicó un voltaje entre 80 y 100 V durante 30 min o hasta que el frente de corrida se desplace la distancia requerida.

Finalmente, el gel fue examinado utilizando un transiluminador Safe Imager™ (Invitrogen) y fotografiado. El fundamento de la detección de los fragmentos de ADN se basa en que el colorante SYBR® es un agente intercalante que se introduce en la estructura secundaria de la doble hélice del ADN y se acopla energéticamente a los ácidos nucleicos que lo forman, de manera que su tasa de emisión fluorescente se incrementa notablemente. El complejo resultante ADN/SYBR presenta un pico de excitación a $\lambda = 498$ nm y un pico de emisión a $\lambda = 522$ nm. Para estimar la longitud de

los fragmentos de ADN separados se empleó el marcador de masa molecular 1 kpb *Bench Top DNA Ladder* (Promega).

5.7. Precipitación de ADN

Los fragmentos de ADN obtenidos luego de la digestión con enzimas de restricción fueron aislados y concentrados, en determinados casos, mediante precipitación con etanol absoluto. Esto se efectuó con el fin de eliminar los fragmentos cortos de ADN liberados, las sales y las enzimas de restricción. Para esto, la muestra se llevó a volumen final de 200 μ l con agua autoclavada adicionando un volumen de NaAc 3 M equivalente al 10% del volumen de la muestra y se agitó. Se agregaron entre 2 y 3 volúmenes de etanol absoluto y la mezcla se incubó a -70°C durante 20 min. Luego, se centrifugó a 13.000 *g* durante 15 min a 4°C y se lavó con 200 μ l de etanol 70% (v/v) frío. Las muestras se centrifugaron nuevamente a 13.000 *g* durante 7 min a 4°C y se secaron en baño seco termostatzado a 37°C durante 10 min. El *pellet* de ADN se resuspendió en un volumen final de 50 μ l en agua Milli Q autoclavada.

5.8. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de ADN separados por electroforesis en geles de agarosa fueron purificados utilizando el *kit* comercial *QIAquick Gel Extration Kit* (QIAGEN), siguiendo las recomendaciones del fabricante, como se describe a continuación:

1. Separar con bisturí la fracción de gel conteniendo la banda de interés y colocar dentro de un tubo Eppendorf. Agregar 3 volúmenes de solución QG por cada volumen de gel (100 mg de gel equivalen aproximadamente a 100 μ l).
2. Incubar durante 10 min en baño de agua a 50°C , mezclando por inversión cada 2-3 min.
3. Transferir la muestra a una columna de purificación (*QIAquick spin column*) dentro de su respectivo tubo colector y centrifugar durante 1 min a 13.000 *g*.
4. Descartar el sobrenadante y agregar 0,5 ml de solución QG a la columna, volviendo a centrifugar de la misma manera.
5. Para lavar, agregar 0,75 ml de solución PE centrifugando durante 1 min a 13.000 *g*. Descartar el sobrenadante y centrifugar de la misma manera, para descartar toda la solución PE residual.
6. Transferir la columna a otro tubo Eppendorf y eluir el ADN con 50 μ l de agua Milli Q autoclavada.

Finalmente, se analizó una alícuota mediante electroforesis en gel de agarosa y se determinó la pureza y la concentración de los fragmentos mediante lectura espectrofotométrica.

5.9. Reacciones de ligación de ADN

Para las reacciones de ligación se utilizó una determinada relación inserto/plásmido en un volumen de reacción de 20 µl, utilizando la enzima T4 ADN Ligasa (Invitrogen), según el protocolo indicado por el proveedor. La mezcla de reacción se incubó ON (overnight, toda la noche) a 4°C. El control de plásmido religado se llevó a cabo reemplazando el volumen correspondiente al inserto por agua Milli Q autoclavada. Luego de la reacción de ligación, se utilizó la mezcla de reacción obtenida para transformar células *E. coli* competentes.

5.10. Preparación de células E. coli TOP 10 competentes, por el método químico

Para la preparación de células competentes se empleó un medio rico en nutrientes que favorece la creación de perforaciones en la pared celular bacteriana y, en consecuencia, la introducción del ADN plasmídico. La triptona y el extracto de levadura presentes en el medio de cultivo ofrecen el nitrógeno y los factores de crecimiento necesarios para la replicación bacteriana y para su recuperación luego del proceso de transformación. El sulfato de magnesio provee los iones Mg^{2+} necesarios para la reacción enzimática que permite la replicación del ADN.

Para la preparación de bacterias competentes se realizó una estría de *E. coli* TOP 10, obtenida de un banco conservado a -70 °C, sobre una placa de agar LB. Se realizó un cultivo ON a 37°C. Se escogió al azar una de las colonias desarrolladas y se inoculó en 5 ml de medio LB, incubándose a 37 °C ON con agitación a 200 rpm. El cultivo se repicó en una dilución 1/100 en 50 ml de medio B (LB suplementado con $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 10mM, glucosa 0,2% (p/v)) y se incubó a 37 °C con agitación a 180 rpm durante 150 min. Posteriormente, las células fueron trasvasadas asépticamente a un tubo de centrifuga estéril enfriado previamente e incubadas durante 15 min en baño de hielo. Las bacterias se cosecharon mediante centrifugación a 4.000 rpm durante 10 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 500 µl de medio LB frío. A esta suspensión se le adicionaron 2,5 ml de solución de conservación (medio LB conteniendo glicerol 36% (p/v), PEG 12% (p/v), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 12mM, esterilizado por filtración con membrana de 0,22 µm) y se mezcló suavemente. Finalmente, la suspensión celular fue dispensada en alícuotas de 100 µl en criotubos fríos y conservada a -70°C hasta su utilización.

Para asegurar la continuidad en la esterilidad del cultivo y estimar la eficiencia de transformación, se deberá realizar un control de las células competentes preparadas. Para esto, descongelar 2 criotubos y transformarlos con 100 ng de un vector plasmídico conocido (control positivo) y sin ADN (control negativo). Las células competentes serán utilizadas sólo cuando la placa del control negativo no muestre desarrollo de colonias y cuando se obtenga buena eficiencia de transformación en el control positivo.

5.11. Transformación de células competentes

En el momento de la transformación se agregó el ADN a una alícuota de células competentes recién descongeladas y se incubó 30 min en baño de hielo. Luego, las células fueron colocadas a 42°C a fin de aumentar la eficiencia de transformación y se incubó inmediatamente en baño de hielo durante 2 min. A cada tubo se le agregaron 700 µl de medio LB y se incubó 60 min a 37°C. Transcurrida la hora de recuperación, se centrifugó a 2.500 *g* durante 5 min, se descartaron 600 µl de sobrenadante y el *pellet* fue resuspendido en el volumen remanente de medio de cultivo. La totalidad de la suspensión celular se distribuyó homogéneamente sobre una placa conteniendo agar LB-Antibiótico. La placa se incubó ON a 37°C.

5.12. Revitalización de cepas bacterianas

Para recuperar las bacterias congeladas, se obtuvo una pequeña porción de material criopreservado y se inoculó en medio LB, para bacterias no transformadas, o en medio LB-antibiótico, para bacterias recombinantes. El criotubo se conservó nuevamente a -70°C y el tubo inoculado se incubó a 37°C durante 16 h.

6. Técnicas de cultivo celular

6.1. Líneas celulares

6.1.1. CHO-K1 (ATCC)

La línea CHO-K1 fue obtenida de ATCC (*American Type Culture Collection®*, USA) (ATCC CCL-61). Es un clon de la línea celular CHO derivada de ovario de hámster chino adulto. Se empleó como huésped para la expresión de rhGAL.

6.1.2. HEK293T/17 (ATCC, CRL-11268)

Es un clon que deriva de la línea celular HEK293, establecida a partir de riñón de embrión humano por Graham en 1977. El clon 293T/17 fue modificado para generar la expresión del antígeno T del virus SV40.

6.1.3. Fibroblastos derivados de pacientes con la enfermedad de Fabry (NIGMS Coriell Institute, USA)

Cultivo de fibroblasto primario obtenidos a partir de banco celular NIGMS Human Genetic Cell Repository. Corresponde a fibroblastos de paciente con variante alélica R220X de la enfermedad de Fabry.

6.2. Medios de cultivo y suplementos para células animales

Todos los medios de cultivos utilizados para el cultivo de células animales fueron preparados utilizando agua Milli Q y esterilizados por filtración, utilizando dispositivos tipo *Steritop* (Merck Millipore) con membranas de 0,22 μm de tamaño de poro. Cada medio preparado queda en cuarentena durante 48 h mientras se llevan a cabo los controles microbiológicos y se conservan a 4°C al resguardo de la luz. A continuación se detallan los medios de cultivo empleados:

6.2.1. CHO-K1adh

Se utilizó el medio de cultivo DMEM/Ham's-F12 5% SFB, el cual consiste en una mezcla 1:1 (v/v) de los medios DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco) y Ham's-F12 (Gibco) suplementados con NaHCO_3 (Gibco) 2,441 g.l^{-1} , glutamina (Sigma-Aldrich) 200 mM, sulfato de gentamicina (Gibco) 0,05 mg.ml^{-1} .

6.2.2. CHO-K1s

Se utilizó el medio comercial EX-CELL® 302 (Gibco), suplementado con glutamina 2 mM.

6.2.3. HEK293T/17 adherentes

Se utilizó un medio compuesto por medio DMEM (Gibco) 13,37 g.l^{-1} , NaHCO_3 1,5 g.l^{-1} , piruvato de sodio 0,11 g.l^{-1} , gentamicina 0,05 g.l^{-1} y SFB 10% (v/v).

6.2.4. Fibroblastos de pacientes con la enfermedad de Fabry

Se utilizó el medio MEM (Minimum Essential Medium, Gibco) suplementado con glutamina 2 mM, NaHCO_3 2,2 g.l^{-1} , piruvato 0,7 g.l^{-1} y SFB sin descomplementar 15% (v/v).

6.2.5. Suero fetal bovino

Para suplementar los medios de cultivo utilizados en cultivos en adherencia, se adicionó a cada medio basal la concentración de SFB deseada. Los SFB utilizados

(Gibco) son de calidad certificada y previo a su uso son descomplementados por incubación en baño de agua termostatzado a 56°C durante 30 min.

6.2.6. Tripsina

Tripsina (Gibco) 0,05% (p/v).

Na₂EDTA (Merck) 0,02% (p/v).

Preparado en solución tampón PBS.

Se respetó una relación de 20 µl de solución de tripsina-EDTA por cada cm² de superficie.

6.3. Sistemas de cultivos de células

Todas las líneas celulares eucariotas se cultivaron en una incubadora a 37°C, con atmósfera de CO₂ al 5% saturada de humedad. Según la etapa de trabajo, se utilizaron cultivos en adherencia o suspensión.

6.3.1. Cultivos en adherencia

Para cultivos en adherencia, se emplearon los siguientes sistemas de cultivo:

- a) Placas multipozos de poliestireno (Greiner Bio-One) de 24, 12 y 6 pozos con una superficie de 2, 5 y 9,6 cm² por pozo, respectivamente.
- b) Frascos T (Greiner Bio-One) de 25, 75 y 175 cm² de superficie.

En todos los casos se mantuvo una relación constante de 0,4 ml de medio de cultivo por cada cm² de superficie.

6.3.2. Cultivos en suspensión en pequeña escala

Para cultivos adaptados a crecer en suspensión, utilizando una incubadora orbital (*Certomat CTplus*, Sartorius, Alemania) con control de humedad y atmósfera de CO₂ al 5%, se emplearon los siguientes sistemas de cultivo:

- a) Tubos CellSTAR® CellReactor™ (Greiner Bio-One).
- b) Frascos Schott de 100, 250 y 500 ml.

6.3.3. Cultivos en biorreactor tanque agitado de 1 l (BIOSTAT Qplus, Sartorius)

Este es un sistema de multivasos de 1 l de volumen de trabajo, compuesto de 6 biorreactores en forma paralela. En nuestro caso se llevaron a cabo cultivos continuos en perfusión, utilizando un filtro tipo *spin* con una malla metálica con un tamaño de poro aproximado de 7 a 8 µm (*Twilled Dutch Weave*, BOPP), como dispositivo de retención celular. El biorreactor cuenta con toda la periferia necesaria para su funcionamiento (electrodo de oxígeno, electrodo redox, electrodo de pH, sensor de

temperatura, agitador tipo *impeller*, sistema de aireación con burbujeador y/o membrana de aireación, botellas de alimentación, siembra y cosecha).

6.4. Determinaciones analíticas en cultivos celulares

6.4.1. Determinación de la concentración y viabilidad de células

El recuento celular se realizó en cámara de Neubauer, estimando la proporción de células muertas por el método de exclusión con azul de tripán. La viabilidad del cultivo se determinó calculando el porcentaje de células viables con respecto a las totales, teniendo en cuenta que la concentración de células totales es la suma de la concentración de células viables y no viables.

6.4.2. Monitoreo del consumo de glucosa y de la producción de lactato y amonio en sobrenadantes de cultivo

a) Glucosa

La determinación de glucosa se llevó a cabo por el método enzimático de la glucosa oxidasa/peroxidasa (GOD/POD), utilizando el *kit* comercial Glucosa Enzimática (*Sociedad de Bioquímicos*, Argentina). El mismo se basa en la oxidación específica de D-glucosa por parte de la enzima GOD, con formación en forma estequiométrica de H₂O₂. Este último, en presencia de 4-aminofenazona y fenol, forma una quinoneimina roja mediante una reacción catalizada por la enzima POD. De esta manera, el dosaje espectrofotométrico del producto coloreado permite la cuantificación indirecta de glucosa en la muestra. El protocolo utilizado es el siguiente:

1. Preparar el reactivo de trabajo de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
2. Encender baño termostático (37°C).
3. En tubos tipo eppendorf, preparar un blanco de reactivos (B_R), un blanco de muestra (B_M), un testigo (T) y las muestras (M) de la siguiente manera:

| | B _R | B _M | T | M |
|---|----------------|----------------|-------|-------|
| Reactivo de trabajo | 1 ml | - | 1 ml | 1 ml |
| Solución testigo de glucosa 1 g.l⁻¹ | - | - | 10 µl | - |
| Muestra | - | 10 µl | - | 10 µl |
| Agua destilada | 10 µl | 1 ml | - | - |

4. Mezclar por inversión e incubar los tubos a 37°C durante 10 min.

5. Leer en espectrofotómetro a $\lambda = 505$ nm. El color es estable 1 h a temperatura ambiente.
6. Calcular la concentración de glucosa en la muestra de acuerdo a la expresión:

$$C_{glucosa} \text{ (g/L)} = [Abs_M - (Abs_{B_M} + Abs_{B_R})] * f * (D^{-1}) \quad (11)$$

Donde

$$f = \frac{1}{(Abs_T - Abs_{BR})} \text{ g.l}^{-1}$$

La reacción de color sigue un comportamiento lineal hasta $4,5 \text{ g.l}^{-1}$ y las diluciones de las muestras deben efectuarse en solución tampón PBS.

b) *Lactato*

La determinación de lactato se llevó a cabo por el método enzimático, utilizando el *kit* comercial *Lactate* (Wiener Lab, Argentina). El mismo se basa en la oxidación específica del lactato por parte de la enzima lactato-oxidasa, con formación en forma estequiométrica de H_2O_2 . Este último, en presencia de TOOS (*N*-etil-*N*-(2 hidroxil-3-sulfopropil) *m*-toluidina) y 4-aminoantipirina, forma un cromógeno mediante una reacción catalizada por la enzima POD. De esta manera, el dosaje espectrofotométrico del producto coloreado ($\lambda = 540$ nm) permite la cuantificación indirecta de lactato en la muestra. El protocolo llevado a cabo es el siguiente:

1. Preparar en placas de 96 pozos el estándar de lactato (por duplicado) y las muestras.
2. Realizar las diluciones de las muestras en solución tampón PBS, teniendo en cuenta que la reacción de color sigue es lineal hasta $1,3 \text{ g.l}^{-1}$. Se recomienda trabajar en un rango de concentraciones de $0,1$ a $0,2 \text{ g.l}^{-1}$.
3. Sembrar $2 \mu\text{l}$ por pozo de estándar y de las diluciones de las muestras. Procesar también un blanco de reactivos (B_R), sembrando $2 \mu\text{l}$ de diluyente. Agregar $175 \mu\text{l}$ por pozo de Reactivo A e incubar en estufa a 37°C durante 2 min.
4. Leer a $\lambda = 540$ nm. La lectura corresponde a los blancos de muestra (B_M).
5. Agregar $35 \mu\text{l}$ por pozo de Reactivo B e incubar en estufa a 37°C durante 5 min (en este paso, es muy importante respetar el tiempo).
6. Leer inmediatamente a $\lambda = 540$ nm (lectura final).

La concentración de las muestras se calcula como:

$$C_{lactato} (g.l^{-1}) = (Abs_M - Abs_{B_M} - Abs_{B_R}) * f * (D^{-1}) \quad (12)$$

Donde

$$f = \frac{Conc. \text{ estándar}}{(Abs_T - Abs_{B_M} - Abs_{B_R})} g.l^{-1}$$

c) *Amonio*

La cuantificación de amonio se llevó a cabo utilizando una adaptación de la técnica desarrollada para la cuantificación de urea, con el *kit Urea (Sociedad de Bioquímicos)*, donde los iones amonio presentes en la muestra se determinan mediante la reacción de Berthelot. La reacción se desarrolla en varias etapas, que tienen lugar en medio alcalino. El indofenol en medio alcalino se disocia dando azul de indofenol, compuesto fuertemente coloreado de azul. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de amonio presente en la muestra. Para acelerar la reacción entre amonio e hipoclorito, disminuyendo el tiempo de incubación, se agrega nitroferricianuro, también llamado nitroprusiato de sodio $[Fe(CN)_5NO]$, como catalizador. El protocolo es el siguiente:

1. Preparar una curva de calibrado empleando como estándar diluciones de una solución de 100 mM de NH_4^+ , generalmente NH_4Cl , de acuerdo con lo siguiente:

| Tubo | Estándar (μ l) | Agua destilada (μ l) | Concentración final de NH_4^+ (mM) |
|------|---------------------|---------------------------|--------------------------------------|
| 1 | 0 | 1000 | 0 |
| 2 | 10 | 990 | 1 |
| 3 | 20 | 980 | 2 |
| 4 | 40 | 960 | 4 |
| 5 | 60 | 940 | 6 |
| 6 | 80 | 920 | 8 |
| 7 | 100 | 900 | 10 |
| 8 | 150 | 850 | 15 |
| 9 | 200 | 800 | 20 |
| 10 | 300 | 700 | 30 |

- Sembrar la curva, al menos por duplicado, las muestras y un blanco de reactivos (B_R) en placa de 96 pozos, de la siguiente manera:

| | B_R (μ l) | Estándar (μ l) | Muestra (μ l) |
|---------------------------------|------------------|---------------------|--------------------|
| Muestra | - | - | 10 |
| Estándar | - | 10 | - |
| Reactivo 1⁽¹⁾ | 100 | 100 | 100 |
| Reactivo 2⁽²⁾ | 100 | 100 | 100 |

⁽¹⁾Solución acuosa de fenol 487,6 mM y nitroprusiato de sodio 1 mM.

⁽²⁾Solución acuosa de hipoclorito de sodio 33,3 mM e NaOH 562,5 mM.

- Incubar a 37°C durante 10 min.
- Leer la absorbancia a $\lambda = 540$ nm en lector de placas multipozo dentro de la hora de finalizada la incubación.

Los valores de concentración de amonio se obtienen por interpolación en la curva de calibrado. La linealidad se mantiene hasta una concentración 15 mM de NH_4^+ .

6.4.3. Estimación de parámetros cinéticos de cultivo

Para estimar los parámetros cinéticos de cultivo, se procedió en primer lugar a calcular la integral de células viables (ICV). Si se considera que una especie P en un cultivo depende de la cantidad de células viables a cada tiempo $X_v(t)$, entonces, la variación de P en el tiempo se puede expresar matemáticamente como:

$$\frac{dP}{dt} = X_v(t) \cdot q_p \quad (13)$$

q_p es una constante asociada con la productividad de una línea celular definida, en un determinado conjunto de condiciones de cultivo. En el caso de los metabolitos estudiados, el valor q_p representa directamente las velocidades específicas de consumo o producción. En el caso de la variación de la concentración celular, la constante de proporcionalidad es igual a la velocidad específica de crecimiento. Integrando la ecuación anterior se tiene que:

$$P(t) = \int dP = q_p \int X_v(t) dt \quad (14)$$

Esta expresión indica que la concentración de la variable en estudio en cualquier tiempo t es proporcional a la integral en el tiempo de la curva de células viables, o ICV, en el mismo tiempo t. De esto se desprende que la curva de producción o consumo de

la especie y la curva integral deben mostrar perfiles análogos y la regresión de una sobre la otra debe ser lineal. La ICV resulta así una medida de la cantidad de células metabólicamente activas presentes en un cultivo durante un período discreto de tiempo que determinan la concentración de una especie P a cada tiempo t y con una productividad q_p . Tiene unidades de cél.h.ml^{-1} .

Una vez estimados los valores ICV, las velocidades específicas de crecimiento celular, consumo de glucosa y producción de lactato y amonio se calcularon graficando en cada caso la producción o consumo acumulado a cada tiempo de cultivo en función de la ICV. A partir de cada gráfica, se realizaron los ajustes lineales correspondientes y se obtuvieron los valores de los parámetros cinéticos q_p a partir de las pendientes de las curvas de calibrado. En todos los casos los cálculos se realizaron utilizando el software *OriginPro 8*.

6.5. Criopreservación de líneas celulares de mamífero

La conservación de las líneas y clones celulares se realizó en nitrógeno líquido, ya que a temperaturas de -196°C se observan deterioros celulares mínimos. Se empleó una técnica de enfriamiento gradual desde temperatura ambiente hasta -196°C .

Para ello, una vez realizado el recuento, suspensiones celulares en fase de crecimiento exponencial se centrifugaron a 200 g durante 5 min a temperatura ambiente en una centrífuga Eppendorf 5403, rotor 16A4-44 (Alemania). Se descartó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en una solución de SFB y dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) en una relación 90:10 (v/v), de manera de obtener una concentración de $1-2 \times 10^6\text{ cél.ml}^{-1}$. La suspensión celular se distribuyó a razón de 1 ml por criotubo (Greiner Bio-One), los que luego fueron guardados en un contenedor apropiado, *MrFrosty* (Nalgene), y llevados a *freezer* de -70°C por 24 h . Este dispositivo contiene alcohol isopropílico, permitiendo que en el interior del mismo la temperatura disminuya a razón de 1°C por minuto, de manera de lograr un enfriamiento gradual de las células, que luego permita una correcta revitalización de las mismas. Finalmente, los criotubos se almacenaron en termos de nitrógeno líquido a -196°C .

6.6. Revitalización de líneas celulares de mamífero

La descongelación rápida de la suspensión celular es esencial para su óptima recuperación. Para la revitalización de las líneas celulares criopreservadas se retiró el criotubo del termo de nitrógeno líquido y se lo sumergió rápidamente en un baño de agua a 37°C . La suspensión celular descongelada se transfirió a un tubo cónico que

contenía 40 ml de medio de cultivo y se centrifugó a 200 *g* durante 5 min a temperatura ambiente. Esta etapa se realizó con el objeto de diluir rápidamente el DMSO y luego eliminarlo, ya que es un reactivo tóxico para las células en cultivo. Se descartó el sobrenadante y el sedimento de células se resuspendió en un volumen de medio de cultivo adecuado. Finalmente, se realizó el recuento celular con el objeto de evaluar la recuperación y la viabilidad celular.

6.7. Desarrollo de líneas celulares recombinantes

6.7.1. Transfección mediante lipofección

El día previo a la transfección, células CHO-K1adh fueron desprendidas enzimáticamente utilizando una solución de tripsina-EDTA. Luego se cuantificaron y cultivaron en placas multipozos de poliestireno de 12 pocillos en una concentración de $1,5 \times 10^5$ cél.ml⁻¹. Veinticuatro horas después, la monocapa del cultivo celular fue lavada con medio basal en cada pocillo con la finalidad de eliminar el SFB, para favorecer así la eficiencia de transfección. Luego se continuó con los siguientes pasos:

1. Colocar 3 µg del vector plasmídico conteniendo la secuencia codificante de rhGAL en un tubo Eppendorf junto con 95 µl de medio basal.
2. Por otro lado, colocar 3 µl de Lipofectamine™ 2000 Reagent (Invitrogen) en un tubo Eppendorf junto con 95 µl de medio basal.
3. Mezclar ambos volúmenes y dejar reposar 20 min a temperatura ambiente para la formación de los complejos ADN-lípido.
4. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, agregar lentamente la mezcla ADN-lípidos a cada pocillo conteniendo células CHO-K1adh.
5. Incubar el cultivo celular en estufa gaseada a 37°C durante 4 h.
6. Una vez transcurrida la incubación, agregar 1,5 ml de medio DMEM/Ham's-F12 al 5% SFB (v/v) de forma tal de completar a 2 ml el volumen de medio cultivo.
7. Cuarenta y ocho horas postransfección, tripsinar las células y cultivarlas nuevamente en placas a una densidad de $1,5 \times 10^5$ cél.ml⁻¹ para repetir los pasos 1 a 6, y efectuar 2 transfecciones sucesivas en idénticas condiciones.

Al momento del subcultivo para cada una de las transfecciones (3 en total), una alícuota de la suspensión celular se mantuvo sin transducir para evaluar luego la productividad de rhGAL en cada caso mediante la técnica de ELISA sándwich y recuento celular.

6.7.2. Transducción

6.7.2.1. Obtención de vectores lentivirales (LVs) codificantes de rhaGAL

Para el ensamblado de LVs se llevó a cabo una transfección transiente mediante lipofección de células HEK293T/17 empaquetadoras con cuatro plásmidos distintos (pMDLg/pRRE, pMD.G, pRSV-REV (Addgene; número de plásmido #12251, #12259, #12253 respectivamente) y el vector de transferencia correspondiente). Luego de 48 h postransfección, se cosecharon los LVs a partir del sobrenadante de cultivo. A continuación se detalla el procedimiento llevado a cabo:

1. Cultivar células HEK293T/17 a razón de 4×10^5 cél.ml⁻¹, en una placa de Petri para cultivo celular de 10 cm de diámetro, ON a 37°C, 5% CO₂
2. El día de la transfección tomar un tubo Falcon con 2,5 ml de medio DMEM y adicionar 50 µl de Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen). Homogeneizar vigorosamente e incubar a temperatura ambiente por 5 min.
3. En otro tubo Falcon con 2,5 ml de medio DMEM adicionar los volúmenes de solución de cada vector que contengan las siguientes cantidades: 2,5 µg pRSV-REV, 3,6 µg pMD.G, 6,5 µg pMDLg/pRRE y 10 µg del vector de transferencia.
4. Mezclar el contenido de ambos tubos e incubar a temperatura ambiente durante 20 min.
5. Retirar el sobrenadante de cultivo de las células HEK293T/17.
6. Una vez transcurridos los 20 min, adicionar los 5 ml de solución conteniendo los complejos lípidos/ADN sobre la monocapa celular. Incubar 4 h a 37°C y 5% CO₂.
7. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, descartar el sobrenadante de cultivo y adicionar 10 ml de medio DMEM conteniendo 10% de SFB. Incubar por 48 h a 37°C y 5% CO₂.
8. Cosechar el sobrenadante de cultivo conteniendo los LVs, trasvasando a un tubo Falcon.

6.7.2.2. Concentración de LVs mediante ultracentrifugación

Una vez cosechados los LVs del sobrenadante de células HEK293T/17 empaquetadoras, se realizaron diferentes y sucesivos pasos de centrifugación y ultracentrifugación, los cuales se escriben a continuación:

1. Cosechar los sobrenadantes y trasvasarlos a tubos cónico Falcon de 50ml.
2. Centrifugar a 800 g y trasvasar a otro tubo.

3. Centrifugar a 2.000 *g* durante 10 min a 4°C, trasvasando luego el sobrenadante a un nuevo tubo. De este modo se garantiza eliminar tanto las células viables como células muertas presentes en el sobrenadante.
4. Luego, filtrar el sobrenadante a través de membranas de 0,45 µm de poro, de modo de eliminar diferentes tipos de *debris* celular y trozos de membrana remanente en el medio.
5. Transferir el medio a un tubo de ultracentrífuga Beckman de 45 ml, centrifugando a 65.000 *g* durante 3 h a 4°C. Durante este tiempo de centrifugación se concentran los LVs.
6. Descartar todo el sobrenadante, escurrir el tubo colocándolo boca abajo sobre un papel absorbente y adicionar sobre el *pellet* 0,4 ml de solución tampón, agitando el tubo e incubando 16 h a 4°C.
7. Finalmente, resuspender el *pellet*, guardándolo a -20°C.

6.7.2.3. Determinación del título de LPs

Para analizar el título de partículas lentivirales producidas se empleó el *kit* de titulación *QuickTiter Lentivirus Titer Kit (Lentivirus-Associated HIV p24, Cell Biolabs)*. Este *kit* fue diseñado para detectar únicamente la proteína p24 del virus del HIV que se encuentra asociada a partículas, y no aquella libre.

El *kit* constituye un inmunoensayo en el que sólo la proteína p24 asociada al *core* viral forma complejos con el reactivo *ViraBind*, pudiendo separarse así de la proteína libre por centrifugación a alta velocidad. El *kit* tiene un LOQ de 0,33 ng.ml⁻¹ de proteína p24.

Para la titulación se empleó el protocolo que se indica a continuación, de acuerdo con lo establecido por el fabricante:

1. Tomar una alícuota del *stock* lentiviral concentrado (resuspenderlo a volumen final 1 ml) y 1 ml de medio de cultivo DMEM (control negativo) y agregar 10 µl de *ViraBind* reactivo A, mezclando por inversión y adición inmediata de 10 µl de *ViraBind* reactivo B, mezclando nuevamente por inversión. Incubar durante 30 min a 37°C.
2. Centrifugar 5 min a 13.000 *g* a temperatura ambiente.
3. Eliminar el sobrenadante y disolver el *pellet* en 250 µl de Diluyente de Muestra. Mezclar e incubar por 30 min más a 37°C.
4. Paralelamente, preparar la curva de estándar de proteína p24, como se indica a continuación:

| Tubo | Estándar (μl) | Diluyente de muestra (μl) | Proteína p24 ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) |
|------|-------------------------------|---|--|
| 1 | 10 | 990 | 100 |
| 2 | 500 del tubo #1 | 500 | 50 |
| 3 | 500 del tubo #2 | 500 | 25 |
| 4 | 500 del tubo #3 | 500 | 12,5 |
| 5 | 500 del tubo #4 | 500 | 6,25 |
| 6 | 500 del tubo #5 | 500 | 3,12 |
| 7 | 500 del tubo #6 | 500 | 1,56 |
| 8 | 0 | 500 | 0 |

5. Incubar los tubos con las diferentes concentraciones del estándar a 37°C durante 30 min.
6. Tomar 100 μl de las muestras tratadas, el estándar de proteína p24, el blanco y el control negativo fueron adicionadas a la placa previamente sensibilizada con anticuerpo anti-p24 provista por el *kit*.
7. Proteger de la luz e incubar a 4°C durante 16 h.
8. Retirar el contenido y lavar los pozos 3 veces con 250 μl de Solución de Lavado.
9. Adicionar 100 μl por pozo de anticuerpo monoclonal anti-p24 conjugado a FITC (Isotiocianato de fluoresceína) diluido 1/1.000.
10. Proteger de la luz e incubar durante 1 h a temperatura ambiente en agitador orbital.
11. Repetir el lavado del paso 8.
12. Adicionar 100 μl de anticuerpo monoclonal anti-FITC conjugado a HRP diluido 1/1.000.
13. Proteger de la luz e incubar durante 1 h a temperatura ambiente en agitador orbital.
14. Repetir el lavado del paso 8.
15. Adicionar 100 μl de solución de sustrato en cada pozo. Incubar a temperatura ambiente en agitador orbital durante 2 a 30 min, de acuerdo con la velocidad de desarrollo de color, evitando la saturación.
16. Detener la reacción enzimática con el agregado de 100 μl de Solución de Detención (H_2SO_4 0,5 N) en cada pozo.
17. Leer inmediatamente la absorbancia en lector de placas *Multiskan* (Thermo Fisher Scientific) a $\lambda=450$ nm.

Para la determinación del título lentiviral en las muestras se calculó la concentración de proteína p24 por interpolación en la curva de calibrado del estándar de proteína p24. Luego se emplearon las siguientes formulas:

$$\text{Concentración p24 (ng.ml}^{-1}\text{)} = \text{p24(ng.ml}^{-1}\text{)} \times \text{factor de dilución} \times \frac{0,25 \text{ ml}}{1,0 \text{ ml}} \quad (15)$$

Dado que hay aproximadamente 2000 moléculas de proteína p24 por partícula lentiviral (LP), entonces 1 LP contiene:

$$\frac{2000 \times 24 \times 10^3}{6 \times 10^{23}} \text{ g de p24} = 8 \times 10^{-5} \text{ pg de p24}$$

$$\text{o } 1 \text{ ng de p24} = 1,25 \times 10^7 \text{ LPs}$$

Para vectores lentivirales adecuadamente empaquetados, 1 unidad de transducción (UT) equivale de 100 a 1.000 LP, por lo que:

$$10^6 \text{ UT.ml}^{-1} \cong 10^{8-9} \text{ LP.ml}^{-1} \cong 8 \text{ a } 80 \text{ ng.ml}^{-1} \text{ p24}$$

$$10^6 \frac{\text{UT}}{\text{ml}} = 10^{8-9} \frac{\text{LP}}{\text{ml}} = 8 \text{ a } 80 \frac{\text{ng}}{\text{ml}} \text{ p24}$$

6.7.2.4. Transducción lentiviral

a) Células CHO-K1adh

Células CHO-K1adh se transdujeron con los LVs concentrados. Se procedió de la siguiente manera:

1. Cultivar células CHO-K1adh en placas multipozos de 6 pozos a una densidad de 3×10^4 cél.ml⁻¹. Luego de incubar a 37°C, CO₂ 5% durante 24 h, remover el sobrenadante de cultivo y adicionar en cada caso los LVs concentrados.
2. Incubar las células en estas condiciones durante otras 24 h, luego remover el medio conteniendo los LVs y reemplazarlo por 3 ml del medio de cultivo correspondiente.
3. Veinticuatro horas luego del cambio de medio de cultivo (48 h postransducción), tratar las células con tripsina, y cultivarlas nuevamente en placas a una densidad de 3×10^4 cél.ml⁻¹ para repetir los pasos 2 y 3, y efectuar 2 transducciones sucesivas en idénticas condiciones.

Al momento del subcultivo para cada una de las transducciones (3 en total), una alícuota de la suspensión celular se mantuvo sin transducir para evaluar luego la

productividad de rhαGAL en cada caso mediante la técnica de ELISA sándwich y recuento celular.

b) Células CHO-K1s

Las células CHO-K1s se transdujeron con LVs concentrados. Para la transducción lentiviral, se procedió de manera similar a lo descrito para el caso de células CHO-K1adh, como se describe a continuación:

1. Cultivar células CHO-K1s en tubos CellSTAR® CellReactor™ a una densidad de $1,8 \times 10^5$ cél.ml⁻¹ y adicionar los LVs concentrados.
2. Luego de 48 h postransducción, centrifugar las células a 800 g y cultivar nuevamente a una densidad de $1,8 \times 10^5$ cél.ml⁻¹ para repetir el paso anterior, y efectuar 2 transducciones sucesivas en idénticas condiciones.

Al momento del subcultivo para cada una de las transducciones (3 en total), una alícuota de la suspensión celular se mantuvo sin transducir para evaluar luego la productividad de rhαGAL en cada caso mediante la técnica de ELISA sándwich y recuento celular.

6.8. Generación de líneas celulares estables

Una vez seleccionadas aquellas líneas con características productivas, las mismas fueron presionadas mediante la adición de puromicina al correspondiente medio de cultivo.

Para llevar adelante la selección, las células con crecimiento en adherencia se cultivaron en placa a una densidad de 2×10^5 cél.ml⁻¹, en medio conteniendo el antibiótico puromicina o zeomicina (Invitrogen), según corresponda. El antibiótico se adicionó el día posterior al último cultivo en placa, para permitir la adhesión de las células al sustrato. Las células se incubaron con el antibiótico hasta observar muerte celular en los pocillos control. Una vez muerto el cultivo control, se retiró el medio de cultivo y se reemplazó por medio sin puromicina, para permitir la recuperación de las células que permanecieron viables. Se mantuvieron en este medio hasta observar la formación de una monocapa celular confluyente. En ese momento, las mismas se trataron con solución de tripsina, se determinó la concentración celular y se repitió el proceso con una concentración mayor de antibiótico.

Mientras que las células en suspensión se cultivaron a una densidad celular de 5×10^5 cél.ml⁻¹, adicionando el antibiótico junto con el medio de cultivo.

La presión de selección se inició con $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de puromicina, en el caso de células CHO-K1adh, mientras que con $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, en el caso de las células CHO-K1s.

6.9. Adaptación de células a su crecimiento en suspensión con medios de cultivo libres de SFB

Diversas metodologías pueden llevarse a cabo para adaptar un cultivo, que crece en condiciones de adherencia y utilizando una elevada concentración de SFB en su medio (entre 5 y 10%), a crecer en suspensión utilizando medio de cultivo libre de suero. El proceso puede realizarse de forma gradual realizando progresivos subcultivos utilizando medio de cultivo con concentraciones de SFB cada vez menores. Esta reducción gradual del SFB se realiza a la par de un aumento gradual de la proporción de medio sin SFB, hasta llegar a un 100% del medio con 0% de SFB. En algún momento de esta transición las células se despegan del sustrato en el que crecen adheridas y pasan a suspensión (a veces formando agregados o cúmulos celulares) donde generalmente son cultivadas en agitación, como una nueva variable de cultivo. La agitación puede ser aplicada de forma magnética con la utilización de frascos tipo *Spinner* o utilizando frascos de cultivo tipo *Schott* o *Erlenmeyer* para uso en cultivo de células animales, utilizando agitadores orbitales.

Para lograr la adaptación de la línea *CHO_{adh} GAL TD3 300* se partió de un cultivo en condición de adherencia (medio DMEM/Ham's-F12 5% SFB, medio A), cuando el cultivo se encontraba en fase exponencial de crecimiento, se procedió a realizar un subcultivo a una densidad de $4 \times 10^5 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$ utilizando una mezcla de medio A y medio EX-CELL® 302 (medio B) en una proporción volumétrica 50:50 (2,5% SFB). El cultivo se mantuvo en esta condición hasta observar que el mismo se adaptó demostrando un crecimiento adecuado que conduce a un estado de confluencia y, simultáneamente, de células que se van desprendiendo y crecen formando agregados celulares, motivo de la disminución de concentración del SFB. Asimismo, se evaluó la morfología celular y la presencia de detritos celulares. Luego de considerar que el cultivo en la condición anterior se encontraba adaptado, se reiteró el procedimiento de subcultivo a una densidad de $4 \times 10^5 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$ empleando sucesivamente proporciones volumétricas de medio de cultivo A y B de 25:75 (1,25% SFB), 15:85 (0,75% SFB) y 10:90 (0,5% SFB). Durante todo este procedimiento se observó desprendimiento celular. Al alcanzar la última condición de adaptación, el cultivo se encontró en su mayor proporción en suspensión, por lo que las células se subcultivaron a una densidad de $4 \times 10^5 \text{ cél}\cdot\text{ml}^{-1}$ empleando sólo medio de cultivo B. Finalmente, se realizaron sucesivos subcultivos en 100% de medio B de manera de alcanzar la adaptación definitiva de la línea en el medio libre de SFB, denominada *CHO_a GAL TD3*

300. A partir de la condición 100%, los cultivos se realizaron en frascos Schott sometidos a agitación orbital a 160 rpm.

Luego de cada etapa de subcultivos y cambio a la siguiente proporción de medios, se realizaron resguardos que se continuaron durante todo el proceso de adaptación.

6.10. Obtención de clones celulares

El momento en el que se realiza el clonado es de vital importancia. En general, se recomienda realizar el clonado en el menor tiempo posible transcurrido desde la generación de la línea celular, dado que los múltiples clones presentan distintas velocidades de crecimiento, pudiendo perderse clones con altos niveles de expresión.

Se debe preparar una suspensión celular de manera de obtener una única célula en una unidad de volumen de medio de cultivo, el cual luego es dispensado en placas de 96 pozos. La probabilidad estadística de obtener pocillos con un único clon se puede incrementar reduciendo la densidad de siembra a un nivel tal que permita depositar una proporción de una sola célula cada 5 o 10 pozos. Debido a las bajas densidades celulares que se emplean en este tipo de clonado, el medio de cultivo debe contener suficiente cantidad de nutrientes y factores de crecimiento que no son aportados por las células vecinas como ocurre en los cultivos densos. Por este motivo, se suelen emplear altas concentraciones de SFB y/o medios condicionados por el crecimiento de otras células o capas de células alimentadoras. El clonado se considera efectivo cuando se observa crecimiento, como máximo, en el 30% de los pozos sembrados con una proporción de una célula cada 10 pozos y una célula por pozo.

Con este fin, se prepararon suspensiones celulares de las líneas a clonar en medio DMEM/Ham's-F12 20% SFB (clonado línea CHO-K1adh) o EX-CELL® 302 SFB 10% (v/v). (clonado línea celular CHO-K1s, condición de semisuspensión). Los pozos que presentaron un único clon se seleccionaron y amplificaron. Para ello, se utilizaron sucesivamente placas de 24 y 6 pozos y frascos T de 25 cm², hasta llegar a obtener una cantidad suficiente de células de cada clon para su criopreservación y análisis. En el caso de los clones en suspensión fue necesario realizar un proceso de readaptación al crecimiento en medio libre de suero y agitación de la suspensión celular.

6.11. Determinación de la productividad celular mediante ELISA sándwich y actividad enzimática *in vitro*

Para determinar la productividad de rhaGAL, células CHO-K1adh se cultivaron en placas a una densidad de 4×10^5 cél.ml⁻¹. Luego de 24 h (o 48 h, según corresponda) se determinó el nivel de rhaGAL en sobrenadante de cultivo y el número de células por ELISA sándwich y recuento celular, respectivamente. Se procedió de igual modo en el caso de las células CHO-K1s, partiendo de una densidad celular de 7×10^5 cél.ml⁻¹ en tubos CellSTAR® CellReactor™.

La productividad se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$Productividad \left(\frac{pg}{cél.x día} \right) = \frac{Concentración \left(\frac{\mu g}{ml} \right) \times 10^6 \left(\frac{pg}{\mu g} \right)}{\frac{Cf+Ci}{2} \left(\frac{cél}{ml} \right) \times t \text{ (día)}} \quad (16)$$

Donde *Ci* es la concentración de células sembradas, *Cf* es la concentración de células al término del cultivo y *t* es el tiempo de incubación.

La actividad enzimática se evaluó mediante la hidrólisis del sustrato artificial 4-metilumbeliferil- α -D-galactósido (4MU- α -Gal, Sigma-Aldrich), como se explicó en el apartado 3 de dicha sección.

6.12. Determinación de secuencias codificantes de LVs

Existen diversas metodologías para la detección de RCL. Por un lado, se puede analizar la presencia de RCL en preparados de LVs utilizando células C8166, las cuales son permisivas a la infección y replicación del virus HIV-1. Por otro lado, se pueden llevar a cabo ensayos para analizar la presencia/ausencia de proteínas de LVs en sobrenadantes de cultivos (ELISA p24). Asimismo, es posible llevar a cabo la determinación de secuencias codificantes de proteínas lentivirales en el genoma celular.

En este caso, la línea celular CHO GAL TD3 50 y el clon P3G2 fueron analizados mediante PCR cuantitativa (*Polymerase chain reaction*, qPCR) para detectar en el genoma de la célula productora genes codificantes de proteínas estructurales de LVs.

6.12.1. Análisis de la presencia/ausencia de secuencias codificantes de proteínas lentivirales en el genoma de la célula productora

Con el objetivo de detectar posibles inserciones de las secuencias correspondientes a las proteínas estructurales de LVs en el genoma de la línea celular

CHOs GAL TD3 50 y el clon P3G2, se realizó la extracción de ADN genómico mediante kit GENOMIC-tip 20/G QIAGEN y se llevó a cabo una reacción de qPCR. La reacción se realizó adicionando cantidades equivalentes a una y diez copias de cada vector, utilizando los plásmidos lentivirales pMDLg/pRRE y pMD.G (Addgene; número de plásmido #12251, #12259, respectivamente) que portan las secuencias de la proteína Gag y Pol, y VSV-G, respectivamente. Para calcular las copias de cada vector, es necesario calcular la masa de cada uno de los vectores, utilizando la siguiente ecuación:

$$m = n \times 1.096 \times 10^{-21} \frac{g}{bp} \quad (17)$$

Dónde:

m: masa del vector en gramos.

n: tamaño del vector en bp.

Como templado de la reacción se utilizó una muestra con una cantidad equivalente a 1×10^4 copias del genoma de interés, para lo cual es necesario calcular la masa del mismo, utilizando la ecuación anterior y teniendo en cuenta el tamaño del genoma en pares de bases (*Database of Genome Sizes* – www.cbs.dtu.dk/databases/DOGS/index.html).

Los cebadores son los siguientes:

| Secuencia a amplificar | Cebadores | Secuencia (sentido 5'-3') |
|----------------------------------|------------------|----------------------------------|
| Proteína de cápside (Gag) | Fw Gag 1 | GAGCCACCCCACAAGATTTA |
| | Rev Gag 1 | TATCCCATTCTGCAGCTTCC |
| Polimerasa (Pol) | Fw Pol 1 | TTGACTCAGATTGGCTGCAC |
| | Rev Pol 1 | TTTAACTTTTGGGCCATCCA |
| Glicoproteína (VSV-G) | Fw pVSV-G 1 | AATGCCCAAGAGTCACAAGG |
| | Rev pVSV-G 1 | CATACCAGCGGAAATCACAA |

Para las reacciones de PCR se utilizó la *master mix 5X HOT FIRE Pol EvaGreen qPCR Mix Plus (Rox)* (Solis BioDyne), preparando la mezcla de reacción de acuerdo con las instrucciones del fabricante:

| Reactivo | Concentración final | Volumen (por tubo de reacción) ^o |
|---|---------------------|--|
| 5X HOT FIRE Pol EvaGreen qPCR Mix Plus | 1 X | 4,0 µl |
| Cebadores Forward 10 µM Reverse 10 µM | 0,25 µM 0,25 µM | 0,5 µl 0,5 µl |
| Templado | X | 10 µl |
| Agua | - | csp 20 µl |

Las reacciones se llevaron a cabo de acuerdo con el siguiente programa de ciclado:

| | | |
|------------------------------------|----------|--------|
| Paso 1. Desnaturalización inicial: | 95°C | 15 min |
| Paso 2. Desnaturalización: | 95°C | 15 s |
| Paso 3. <i>Annealing</i> | 65°C | 20 s |
| Paso 4. Extensión | 72°C | 20 s |
| Volver al paso 2: | 40 veces | |
| Paso 5. Conservación 4°C | | |

De esta forma, si en una muestra que posee 1×10^4 copias de genoma no es posible detectar la presencia de la secuencia *target* (no se observa amplificación), se concluye que misma estaría ausente ya que la reacción de qPCR tiene la capacidad de detectar hasta 1 copia. Como control positivo, se emplearon los oligonucleótidos utilizados en la determinación del número de copias de la secuencia de interés, como se describe a continuación.

6.12.2. Análisis del número de copias del TG en el genoma

Con el objetivo de analizar cuantas copias de la secuencia de interés fueron insertadas en el genoma de la línea celular CHO GAL TD3 50 y el clon P3G2, se llevó a cabo una qPCR utilizando un set de cebadores para una región contenida dentro de la secuencia WPRE, la cual forma parte del vector *pLV EF1 rhGal F*.

En este ensayo, se construyó una curva de calibrado utilizando el vector *pLV EF1 rhGal F*, en la cual los puntos de la misma contenían la cantidad de ADN correspondiente a 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 y 1×10^7 de copias del vector. Como templado de reacción se utilizó una muestra que posea 1×10^6 de copias del genoma de interés. Para realizar dichos cálculos se tuvo en cuenta la masa del vector y del genoma, utilizando la ecuación 17.

Los cebadores utilizados son los siguientes:

| Secuencia a amplificar | Cebadores | Secuencia (sentido 5'-3') |
|------------------------|-----------|---------------------------|
| WPRE | Fw wpre | CGCTGCTTTAATGCCTTTGT |
| | Rev wpre | GGGCCACAACCTCCTCATAAA |

Para las reacciones de PCR se utilizó la *master mix 5X HOT FIRE Pol EvaGreen qPCR Mix Plus (Rox)* (Solis BioDyne), preparando la mezcla de reacción de acuerdo con las instrucciones del fabricante (descrito en el apartado anterior (6.12.1)).

A partir del resultado de la reacción, se confeccionó una gráfica con los valores de C_T (ciclo en el cual la curva de amplificación supera la línea de base o *threshold*) para cada punto de la curva de calibrado, expresado en número de copias. El eje abscisas se coloca en escala logarítmica y se obtiene una curva de calibrado (Figura 93).

Con el dato de C_T de la muestra incógnita se calcula el número de copias presente en la misma. Finalmente, teniendo en cuenta que en la reacción se utilizó como templado una muestra con 1×10^6 copias de genoma, se obtiene el número de copias de TG para cada genoma.

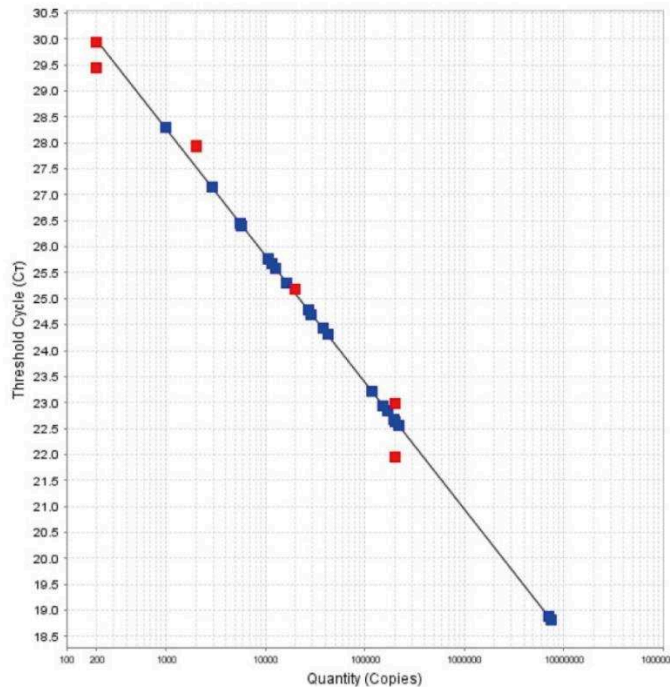


Figura. 93. Análisis del número de copias de TG por qPCR. Muestras del genoma de la línea celular CHO Gal TD3 50 y el clon P3G2 fueron analizadas, utilizando un set de cebadores para la secuencia WPRE. Se confeccionó una curva de calibrado utilizando el plásmido *pLV EF1 rhGal F*.

7. Purificación

7.1. Cromatografía IEX

Los sobrenadantes se clarificaron empleando filtros de membrana de 0,45 µm (Sartobran P, Sartorius). Como primer paso cromatográfico, se emplearon 5 o 20 ml (según corresponda) de resina IEX (*DEAE Sepharose Fast Flow*, GE Healthcare) empaquetada en una columna XK 16/20 de 1,6 x 2,48 cm, conectada a un ÄKTA explorer 100 Air (GE Healthcare). El flujo de trabajo seleccionado fue tal que permitió garantizar un tiempo de retención de 10 minutos.

El protocolo desarrollado para la purificación se describe a continuación:

Sanitización inicial

| | |
|------------------------|----------------------|
| Enjuague: | agua Milli Q (3 VC). |
| Depirogenación: | NaOH 0,1 M (2-3 VC). |
| Enjuague: | agua Milli Q (3 VC). |
| Regeneración: | NaCl 2 M (3 VC). |
| Enjuague: | agua Milli Q (3 VC). |

Equilibrado: equilibrar la matriz con 5 VC de solución de equilibrado (Solución tampón fosfato de sodio 10 mM pH 6,0).

Siembra: sembrar un volumen de muestra acondicionada en una proporción 1:3 (muestra: solución equilibrado), realizando dicha dilución en línea. Recolectar el FT en una única fracción para su posterior análisis.

Lavado 1: lavar la matriz con 5 VC de solución de equilibrado

Elución por aumento de la fuerza iónica: emplear 5 VC de una solución NaCl 0,18 M en tampón fosfato de sodio 10 mM pH 6,0 trabajando al mismo flujo utilizado durante la etapa de equilibrado. Recolectar las fracciones y conservarlas a -20°C para su posterior análisis y purificación.

Sanitización final:

| | |
|------------------------|----------------------|
| Enjuague: | agua Milli Q (3 VC). |
| Depirogenación: | NaOH 1 M (2-3 VC). |
| Enjuague: | agua Milli Q (3 VC). |
| Regeneración: | NaCl 2 M (3 VC). |
| Enjuague: | agua Milli Q (3 VC). |

Conservación de la matriz: lavar la matriz con solución de conservación (etanol 20% v/v, agua) y guardar a 4°C hasta su reutilización.

7.2. Cromatografía HIC

Como segundo paso cromatográfico, se emplearon 3 o 5 ml (según corresponda) de resina HIC (*Butyl Sepharose 4 Fast Flow*, GE Healthcare) empaquetada en una columna XK 16/20 de 1,6 x 2,48 cm. El flujo de trabajo seleccionado fue tal que permitió garantizar un tiempo de retención de 10 minutos. Las fracciones del eluato obtenido luego del primer paso de purificación se acondicionaron con NaCl. El protocolo desarrollado para la purificación se describe a continuación:

Enjuague: 3 VC agua Milli Q.

Depirogenación: 3 VC NaOH 0,1 M.

Enjuague: 3 VC agua Milli Q.

Equilibrado: equilibrar la matriz con 10 VC de solución de equilibrado (NaCl 2 M tampón fosfato de sodio 10 mM pH 6,0).

Siembra: sembrar un volumen de muestra acondicionada. Recolectar el FT en una única fracción para su posterior análisis.

Lavado 1: lavar la matriz con 5 VC de solución de equilibrado.

Lavado 2: lavar la matriz con 5 VC de solución NaCl 2 M tampón fosfato de sodio 10 mM pH 7,5

Elución por descenso de la fuerza iónica: emplear 10 VC de una solución NaCl 0,75 M tampón fosfato de sodio 10 mM pH 7,5 trabajando al mismo flujo utilizado durante la etapa de equilibrado. Recolectar las fracciones, diafiltrarlas y conservarlas a -70°C en solución tampón PBS para su posterior análisis.

Enjuague: 3 VC agua Milli Q.

Depirogenación: 3 VC NaOH 0,1 M.

Enjuague: 3 VC agua Milli Q.

Conservación de la matriz: lavar la matriz con solución de conservación (etanol 20% v/v, agua) y guardar a 4°C hasta su reutilización.

7.3. Cromatografía en fase reversa

El análisis de las moléculas purificadas junto con la molécula de referencia se realizó mediante cromatografía en fase reversa, empleando una columna C4 Júpiter™ (Phenomenex, USA) de 4,15 ml (250 mm x 4,6 mm), rellena con partículas de 5 µm de diámetro y un tamaño de poro de 300 Å. La cromatografía se realizó a temperatura ambiente en un cromatógrafo líquido de alta performance analítico (Alliance HPLC System, Waters, USA), empleando un flujo de 1 ml.min⁻¹. La columna

se equilibró con una solución acuosa de ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% (v/v) en acetonitrilo al 20% (v/v). Luego de la inyección automática de 100 µl de muestra se utilizó el perfil de elución que se describe en la Tabla 29, realizando la detección de la proteína a una $\lambda = 210$ nm. La integración de las áreas de los picos se realizó empleando el software Empower™ 2 Chromatography Data Software (Waters).

Tabla. 29. Gradiente cromatográfico HPLC-C4.

| Tiempo (min) | % Fase móvil A* | % Fase móvil B** |
|--------------|-----------------|------------------|
| 0 | 80 | 20 |
| 5 | 80 | 20 |
| 40 | 20 | 80 |
| 45 | 0 | 100 |
| 55 | 0 | 100 |
| 60 | 80 | 20 |

*Fase A: solución acuosa TFA 0,1% (v/v); **Fase B: ACN, TFA 0,1% (v/v).

7.4. Espectrofotometría

La cuantificación de muestras purificadas se llevó a cabo por medición espectrofotométrica. De esta manera, conociendo su coeficiente de extinción, el cálculo de la concentración se realizó por lectura de absorbancia a $\lambda = 280$ nm, según la Ley de Beer-Lambert. Se empleó un espectrofotómetro UV-visible (Ultrospec 2000, GE Healthcare) y cubetas de cristal de cuarzo.

7.5. Método de Bradford. Cuantificación de proteínas totales

Se empleó la técnica de Bradford. El fundamento de la misma consiste en el desplazamiento del máximo de absorbancia del colorante azul brillante *Coomasie* luego de su unión con los aminoácidos aromáticos presentes en la proteína. La intensidad de color generado es directamente proporcional a la concentración de proteína total presente en la muestra. Para realizar la técnica se utilizaron placas de fondo plano de 96 pozos. Se dispensaron 20 µl de muestra (a una correspondiente dilución) por pozo. Luego, se adicionaron 0,2 ml de solución colorante. Se incubó durante 10 min (hasta saturación de color) a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a $\lambda = 620$ nm en lector de placas. La curva de calibrado se realizó empleando diluciones de una solución de ASB desde 100 a 10 µg.ml⁻¹. La solución colorante contiene 0,0125 g de azul brillante *Coomasie* G250, 6,25 ml de alcohol etílico 95% (v/v), 12,5 ml de ácido fosfórico 85% (v/v) y agua Milli Q para volumen final 125 ml.

8. Métodos de caracterización enzima pura

8.1. Caracterización fisicoquímica

8.1.1. SDS-PAGE e IEF

La masa molecular aparente y el patrón de isoformas de las muestras purificadas fueron evaluadas mediante ensayos de SDS-PAGE e IEF, seguido de tinción por azul brillante de *Coomassie*, como se explicó anteriormente.

8.1.2. Espectrofluorimetría

Las mediciones espectrofluorimétricas se realizaron utilizando un espectrómetro de luminiscencia Perkin-Elmer LS-55 equipado con una lámpara de descarga de xenón, monocromadores de tipo Monk-Gillieson y un fotomultiplicador cerrado conectado a una PC Sempron de AMD usando Windows Xp. La adquisición de datos se realizó utilizando el software FL Winlab v4.00.03 suministrado por Perkin Elmer. En todos los casos se utilizaron células de cuarzo con paredes planas de 700 μl .

Se utilizó un ancho de ranura de 5 nm en los monocromadores de excitación y 7 nm en monocromadores de emisión, se estableció un voltaje de detector de 650 V y una velocidad de adquisición de 600 nm.min⁻¹. Los espectros de emisión se registraron de 290 a 500 nm en pasos de 1 nm (a 278 nm de longitud de onda de excitación).

8.2. Caracterización bioquímica

8.2.1. Actividad específica *in vitro*

La actividad enzimáticas específicas *in vitro* de las moléculas de r α GAL purificadas y Fabrazyme® se midieron como se describió anteriormente.

8.2.2. Estabilidad en plasma

La estabilidad frente a la acción de las proteasas fue evaluada mediante la incubación en plasma humano. Se preparó plasma fresco en nuestro laboratorio a partir de sangre periférica de un único donante. Inmediatamente después de la recolección, la sangre total tratada con heparina se centrifugó a 4.000 rpm durante 5 min a 20°C. Luego, para eliminar las plaquetas, el plasma se centrifugó a 6.400 rpm durante 5 min a 4°C, se inactivó la actividad de las moléculas de complemento por calentamiento a 56°C durante 30 min y se almacenó a -20°C hasta su uso. La muestra se obtuvo con el consentimiento informado del donante.

Se preparó una solución de 5 ng.ml⁻¹ de cada una de las moléculas en plasma (r α GAL o Fabrazyme®) y se incubaron a 37°C durante 0, 15, 30, 45 y 60 min. Después de la exposición al plasma, se analizó la actividad enzimática residual de las muestras (en comparación con t = 0), utilizando 4MU- α -Gal como sustrato

artificial, como se explicó anteriormente. El ensayo se realizó por duplicado, a partir de tres experimentos individuales. Los resultados obtenidos para cada molécula fueron comparados utilizando la prueba ANOVA y la prueba de Fisher (LSD, *least significant difference*).

8.2.3. Parámetros cinéticos

Los parámetros cinéticos enzimáticos se midieron usando el ensayo 4MU- α -Gal. La reacción se inició mediante la adición de rh α GAL o Fabrazyme® a una concentración final de 5 ng.ml⁻¹. Las mediciones se generaron a partir de tres experimentos individuales de ocho puntos de datos cada uno. Los parámetros cinéticos se calcularon utilizando el método gráfico Lineweaver-Burk (doble recíproco) y Eadie Hofstee.

8.3. Análisis de glicosilación

8.3.1. Composición de monosacáridos

El análisis de la composición de monosacáridos permite determinar la cantidad y el tipo de monosacáridos presentes en una muestra. Generalmente, se emplea como técnica complementaria a otros métodos que permiten llevar a cabo, en conjunto, un análisis estructural detallado de los glicanos provenientes de la glicoproteína en estudio.

La cuantificación de Gal, Man, Fuc, y GlcNAc en muestras purificadas se realizó mediante HPAEC-PAD (High performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection), empleando el sistema DIONEX ICS-5000 equipado con una columna CarboPac™ 246 PA20. Este tipo de cromatografía es utilizada para separar analitos aniónicos o que pueden ionizarse en condiciones de pH elevado. La separación se produce en columnas compuestas por partículas de poliestireno divinilbenceno unidas electrostáticamente a microesferas que contienen grupos funcionales intercambiadores de aniones. Se utilizaron como fases móviles NaOH 200 mM y agua Milli Q.

Los diferentes monosacáridos presentes en las muestras fueron identificados y cuantificados utilizando un estándar comercial que contiene 10 nmol de cada monosacárido (CM-Mono-Mix-10, Ludger). Para escindir tanto los monosacáridos neutros como los aminados, el estándar y las muestras fueron sometidos a dos tipos diferentes de hidrólisis ácidas, durante 3 h a 100°C. La hidrólisis con TFA 2 M permitió liberar y analizar monosacáridos neutros (Gal, Man y Fuc), mientras que la hidrólisis con HCl 6 M se empleó para el análisis de monosacáridos aminados (GlcNAc). Luego, la muestra fue llevada nuevamente a sequedad y finalmente

resuspendida en 40 µl de agua Milli Q, inyectándose diferentes cantidades a los fines de cuantificar correctamente ambos tipos de monosacáridos.

8.3.2. Cuantificación de ácido siálico (Neu5Ac y Neu5Gc) y M6P

La cuantificación de Neu5Ac, Neu5Gc y M6P en las diferentes alícuotas de las muestras purificadas y la molécula de referencia, se realizó mediante cromatografía de intercambio iónico a pH elevado con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD), empleando el sistema DIONEX ICS-5000 equipado con una columna CarboPac™ 246 PA20 (Thermo Fisher Scientific Dionex). Se utilizaron como fases móviles NaOH 100 mM y AcONa 500 mM / NaOH 100 mM.

Los ácidos siálicos y los residuos de M6P fueron escindidos de las glicoproteínas mediante hidrólisis ácida. Para ello, en primer lugar se llevaron a sequedad 60 µg de proteína usando un concentrador (Concentrator Plus, Eppendorf). Posteriormente la proteína se resuspendió en 200 µl HCl 0,1 M, incubándose a 80°C durante 1 h o en 200 µl de TFA 6,75 M a 100°C durante 1.5 h, para liberar el contenido de ácido siálico o M6P, respectivamente. El procedimiento de hidrólisis fue similar al descrito para la cuantificación de monosacáridos.

Para la identificación y cuantificación de los diferentes picos derivados de las muestras a analizar se utilizaron estándares de Neu5Ac y Neu5Gc (Calbiochem) y de M6P (Sigma-Aldrich), a los cuales se les realizó el mismo tratamiento que a las muestras.

8.3.3. Análisis y composición del perfil de N-glicanos

8.3.3.1. N-deglicosilación enzimática

Para confirmar la presencia de N-glicanos unidos a las diferentes proteínas, las muestras purificadas se sometieron a una reacción de N-deglicosilación enzimática, utilizando el *kit* PNGasa F (Biolabs Inc.). Con este fin, se incubaron 20 µg de proteína con 2 µl de solución tampón de desnaturalización 10 X ((SDS 5% (p/v), 2-ME 10% (v/v)) durante 10 min a 100°C. Posteriormente, se adicionó 1/10 de volumen de solución tampón G7 (fosfato de sodio 0,5 M, pH 7,5) y 1/10 de volumen del detergente NP-40 10% (v/v). Finalmente, se agregaron 15 U de PNGasa F y se incubó durante toda la noche a 37°C.

Para el análisis de N-glicanos mediante técnicas cromatográficas se llevó a cabo la digestión de 150 µg de proteína purificada, aumentando el número de tubos empleados y respetando los volúmenes indicados para cada uno de ellos.

Las muestras obtenidas fueron analizadas en geles SDS-PAGE, seguidos de tinción con azul brillante de *Coomasie*. La digestión completa de las variantes *N*-glicosiladas fue verificada mediante comparación con la variante sin *N*-deglicosilar.

8.3.3.2. Marcación de los N-glicanos con el fluoróforo 2-AB

Los *N*-glicanos provenientes de la digestión con PNGasa F fueron purificados mediante precipitación etanólica. Para ello, se adicionaron 300 μ l de etanol absoluto frío a la mezcla proveniente de la digestión, incubándose a -70°C durante 1 h. Seguidamente, las muestras fueron centrifugadas durante 10 min a 10.000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y el *pellet* fue lavado con 100 μ l de etanol 70% (v/v) frío. Luego de centrifugar nuevamente bajo las mismas condiciones, el sobrenadante fue recuperado junto con el anterior, descartándose el *pellet*.

El sobrenadante conteniendo los *N*-glicanos fue llevado a sequedad y posteriormente marcado con el fluoróforo 2-AB (Sigma-Aldrich). Para ello, se adicionaron 5 μ l de una solución conteniendo 0,0576 g de 2-AB en 1.200 μ l de una mezcla 7:3 de DMSO: ácido acético. La marcación se llevó a cabo durante 2 h en baño de agua a 65°C . Transcurrido este tiempo, los *N*-glicanos fueron purificados del exceso de 2-AB mediante cromatografía ascendente. Para ello, las muestras fueron sembradas en el extremo de papeles Whatman de 3 x 15 cm previamente lavados 3 veces con agua Milli Q. Posteriormente, los papeles fueron sumergidos en ACN sin tocar el punto de siembra. El ACN asciende por capilaridad a través del papel arrastrando el exceso de 2-AB. Una vez culminado el proceso cromatográfico, los *N*-glicanos marcados fueron eluidos desde el papel empleando 1,5 ml de agua Milli Q y posteriormente filtrados empleando filtros para jeringa de PVDF 0,45 μm (Millipore). Finalmente, las muestras fueron llevadas a un volumen final de 40 μ l en concentrador.

Alícuotas de las muestras marcadas con 2-AB se trataron con TFA 2% (v/v) a 80°C durante 1 h (para eliminar el contenido de ácido siálico) o con 5 U de fosfatasa alcalina (ALP, Alkaline Phosphatase, calf intestinal, Promega, USA) en un volumen final de 50 μ l y se incubaron a 37°C ON (para hidrolizar los grupos fosfato).

8.3.3.3. Cromatografía de intercambio aniónico débil (WAX) de los glicanos marcados

Los *N*-glicanos marcados con 2-AB fueron evaluados por cromatografía de intercambio iónico débil con el fin de determinar la proporción de estructuras neutras, con alto contenido de manosa y mono-, bi-, tri- y tetrasialiladas presentes en la muestra. Para ello se utilizó un cromatógrafo HPLC Waters Alliance acoplado a un

detector de fluorescencia (λ_{exc} = 330 nm; λ_{em} = 420 nm). Las muestras fueron sembradas en una columna ASAHIPAK ES-502N7C (100 x 7,5 mm; 272 SHODEX). Esta cromatografía se basa en la distinta de carga de los glicanos que permite su retención diferencial por los grupos cargados de la matriz de intercambio aniónico. Así, en este tipo de columna, el tiempo elución de los *N*-glicanos está determinado por el número de cargas presentes en la molécula (debido a la presencia de ácidos siálicos, sulfatos y fosfatos) y, en cierta medida, por el tamaño del glicano.

Para la asignación de las diferentes estructuras de *N*-glicanos cargados, el perfil obtenido mediante cromatografía de intercambio iónico fue comparado con el perfil de elución de *N*-glicanos de un estándar de fetuina (Sigma-Aldrich); mientras que para los *N*-glicanos de alta manosa mono-fosforilados se empleó un estándar phosphorylated oligmannosidic (TheraProteins, Portugal).

9. Ensayo de valoración de la actividad biológica: internalización por células

Para que la administración exógena de rh α GAL sea efectiva en el tratamiento de la enfermedad de Fabry, la enzima debe ser captada por las células y transportada hacia los lisosomas en donde cataliza la hidrólisis de las uniones α -galactosídicas de los glicolípidos. Esto es llevado a cabo mediante la interacción de los residuos de M6P presentes en los glúcidos de la enzima con los receptores de M6P de la superficie celular, lo que indica la importancia de una correcta glicosilación para que la enzima sea funcional. Por lo tanto, la actividad enzimática *in vitro* no necesariamente es un reflejo de la bioactividad de la proteína, ya que la ausencia de modificaciones postraduccionales adecuadas afecta la captura de la enzima por las células blanco. Para evaluar la internalización celular de la rh α GAL se utilizarán células HEK293T/17 y fibroblastos derivados de pacientes con la enfermedad de Fabry (NIGMS Coriell Institute), los cuales se sembraron en placas de cultivo y se incubaron con diluciones de las muestras conteniendo rh α GAL. Luego de 24 h, se retiró el medio de cultivo (el cual se almacenó a -20°C para su posterior análisis) y las células se lisaron mediante sonificado en baño durante 20 min. Posteriormente, se midió la actividad enzimática en los lisados celulares y sobrenadante de cultivos utilizando el sustrato 4MU- α -Gal, como se describió previamente. El contenido total de proteína se determinó mediante el método de Bradford.

9.1. Microscopía de fluorescencia

Adicionalmente, los fibroblastos tratados con la enzima se incubaron con anticuerpos policlonales específicos anti-rhαGAL de conejo para estudiar su localización subcelular. A continuación se describe el protocolo desarrollado:

1. Cultivar las células a analizar a razón de 2×10^4 cél.ml⁻¹ en placas de cultivos de 24 pozos, durante 24 h a 37°C, 5% CO₂.
2. Retirar sobrenadante de cultivo y lavar la monocapa celular suavemente con solución tampón PBS.
3. Fijar células con una solución de paraformaldehído 4% (p/v), durante 30 min a temperatura ambiente.
4. Realizar 2 lavados con solución PBS.
5. Realizar permeabilización de la membrana plasmática con solución tritón 0,2% (v/v) en PBS-ASB 0,1%, durante 15 minutos a temperatura ambiente.
6. Incubar con una dilución 1/500 del anticuerpo policlonal anti-rhαGAL de conejo, durante 1.5 h a temperatura ambiente.
7. Repetir paso 4.
8. Incubar con una dilución 1/1.000 del anticuerpo (*Alexa Fluor488*) *goat anti-rabbit igG H and L* (ab 150081) e incubar durante 1 h a temperatura ambiente.
9. Repetir el paso 4.
10. Incubar la monocapa celular durante 5 min con una dilución 1/100 de Hoechst, para tinción diferencial de núcleos.
11. Repetir paso 4.
12. Analizar la localización subcelular de la glicoproteína G en microscopio de fluorescencia invertido (*Eclipse Ti-S*, Nikon Instruments Inc).

10. Análisis estadístico

El análisis de la calibración metodológica de cada técnica analítica desarrollada se realizó empleando el programa Statgraphics Centurion XVI. Por otro lado, los resultados entre grupos fueron comparados utilizando el análisis de la varianza ANOVA, en el caso de cumplirse los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza; caso contrario se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal-wallis, considerando la existencia de diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes a otras (comparación múltiple) se aplicó el método de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- [1] AL Demain, P Vaishnav (2009) Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv* 27: 297-306.
- [2] DC Andersen, L Krummen (2002) Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Biochem Eng J* 13: 117-123.
- [3] DP Clark, NJ Pazdernik (2016) Recombinant Proteins, En: *Biotechnology*, Elsevier, p. 335-363.
- [4] Y Durocher, M Butler (2009) Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Curr Opin Biotechnol* 20: 700-707.
- [5] FR Schmidt (2004) Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl Microbiol Biotechnol* 65: 363-372.
- [6] L Palomares (2001) Aplicaciones de bioingeniería en la producción de proteínas recombinantes por células de insecto. *BioTecnología* 9: 22-31.
- [7] MMJ Cox (2012) Recombinant protein vaccines produced in insect cells. *Vaccine* 30: 1759-1766.
- [8] R Assenberg, PT Wan, S Geisse S, y col (2013) Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research. *Curr Opin Struct Biol* 23: 393-402.
- [9] G Parenti, G Andria, A Ballabio (2015) Lysosomal Storage Diseases: From Pathophysiology to Therapy. *Annu Rev Med* 66: 471-486.
- [10] D-B Oh (2015) Glyco-engineering strategies for the development of therapeutic enzymes with improved efficacy for the treatment of lysosomal storage diseases. *BMB Rep* 48: 438-44.
- [11] T Kizhner, Y Azulay, M Hainrichson, y col. (2015) Characterization of a chemically modified plant cell culture expressed human α -Galactosidase-A enzyme for treatment of Fabry disease. *Mol Genet Metab* 114: 259-267.
- [12] FM Wurm (2004) Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nat Biotechnol* 22: 1393-1398.
- [13] P Hossler, SF Khattak (2009) Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. *Glycobiology* 19: 936-949.
- [14] T Dingermann (2008) Recombinant therapeutic proteins: Production platforms and challenges. *Biotechnol J* 3: 90-97.
- [15] M Thiry, D Cingolani (2002) Optimizing scale-up fermentation processes. *Trends Biotechnol* 20: 103-105.
- [16] M-F Clincke, C Mölleryd, Y Zhang, y col. (2013) Very high density of CHO cells in perfusion by ATF or TFF in WAVE bioreactor™. Part I. Effect of the cell

- density on the process. *Biotechnol Prog* 29: 754-767.
- [17] B Sekhon, V Saluja (2011) Biosimilars: an overview. *Biosimilars* 1: 1-11.
- [18] European Medicines Agency (EMA) (2017) *History of EMA*. http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/about_us/general/general_content_000628.jsp&mid=WC. 3 de noviembre de 2017.
- [19] FDA (2017) *Laws Enforced by FDA*. <https://www.fda.gov/RegulatoryInformation/LawsEnforcedbyFDA/default.htm>. 3 de noviembre de 2017.
- [20] ANMAT (2017) *A.N.M.A.T.*. http://www.anmat.gov.ar/webanmat/institucional/que_es_la_ANMAT.asp. 3 de noviembre de 2017.
- [21] Instituto de Salud Carlos III U de B (2017) *Ensayos clínicos*. <http://www.ub.edu/legmh/ereensay.htm>. 3 de noviembre de 2017.
- [22] AD Bandaranayake, SC Almo (2014) Recent advances in mammalian protein production. *FEBS Lett* 588: 253-260.
- [23] EF Mufarrege, S Antuña, M Etcheverrigaray, y col. (2014) Development of lentiviral vectors for transient and stable protein overexpression in mammalian cells. A new strategy for recombinant human FVIII (rhFVIII) production. *Protein Expr Purif* 95: 50-56.
- [24] DL Hacker, S Balasubramanian (2016) Recombinant protein production from stable mammalian cell lines and pools. *Curr Opin Struct Biol* 38: 129-136.
- [25] P Mueller, D Wirth, J Unsinger, y col. (2003) *Genetic approaches to recombinant protein production in mammalian cells. Handbook of Industrial Cell*. Ed: Vinci V, Parekh S. Humana Press Inc., Totowa, NJ, p. 21-51.
- [26] M De Jesus, FM Wurm (2011) Manufacturing recombinant proteins in kg-ton quantities using animal cells in bioreactors. *Eur J Pharm Biopharm* 78: 184-188.
- [27] K Ding, L Han, H Zong y col (2017) Production process reproducibility and product quality consistency of transient gene expression in HEK293 cells with anti-PD1 antibody as the model protein. *Appl Microbiol Biotechnol* 101: 1889-1898.
- [28] A Gugliotta (2016) *Diseño y optimización de un proceso de producción de muteínas de interferón- α 2b humano con mayor actividad biológica mediante glicosilación en células de mamífero*. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas. Universidad Nacional del Litoral. 1-215.
- [29] ME Lalonde, Y Durocher (2017) Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. *J Biotechnol* 251: 128-140.
- [30] N Harraghy, D Calabrese, I Fisch I, y col. (2015) Epigenetic regulatory elements:

- Recent advances in understanding their mode of action and use for recombinant protein production in mammalian cells. *Biotechnol J* 10: 967-978.
- [31] F Wurm (2013) CHO Quasispecies—Implications for Manufacturing Processes. *Processes* 1: 296-311.
- [32] D Wirth, L Gama-Norton, P Riemer, y col. (2007). Road to precision: recombinase-based targeting technologies for genome engineering. *Curr Opin Biotechnol* 18: 411-419.
- [33] S Turan, C Zehe, J Kuehle J, y col. (2013) Recombinase-mediated cassette exchange (RMCE) - A rapidly-expanding toolbox for targeted genomic modifications. *Gene* 515: 1-27.
- [34] AM Moreno (2017) Therapeutic genome engineering via CRISPR-Cas systems. *Syst Biol Med* 9: e1380.
- [35] L Baranyi, A Roy, HD Embree, y col. (2010) Lentiviral vector-mediated genetic modification of cell substrates for the manufacture of proteins and other biologics. *PDA J Pharm Sci Technol* 64: 379-85.
- [36] P-C Virginia, E de Russo-Carbolante, D Covas (2012) Advances in lentiviral vectors: a patent review. *Recent Patents DNA Gene Seq* 6: 82-90.
- [37] C Delenda (2004) Lentiviral vectors: Optimization of packaging, transduction and gene expression. *J Gene Med* 6: S125-S128.
- [38] O-W Merten, M Hebben, C Bovolenta (2016) Production of lentiviral vectors. *Mol Ther Methods Clin Dev* 3: 16017.
- [39] T Sakuma, MA Barry, Y Ikeda (2012) Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem J* 443: 603-618.
- [40] HT Spencer, G Denning, RE Gautney, y col. (2011) Lentiviral vector platform for production of bioengineered recombinant coagulation factor VIII. *Mol Ther* 19: 302-309.
- [41] P Escarpe, N Zayek, P Chin, y col. (2003) Development of a sensitive assay for detection of replication-competent recombinant lentivirus in large-scale HIV-based vector preparations. *Mol Ther* 8: 332-341.
- [42] K Cornetta, L Duffy, CJ Turtle, y col. (2017) Absence of Replication-Competent Lentivirus in the Clinic: Analysis of Infused T Cell Products. *Mol Ther* 25: 1-9.
- [43] K Swiech, V Picanço-Castro, DT Covas (2012) Human cells: New platform for recombinant therapeutic protein production. *Protein Expr Purif* 84: 147-153.
- [44] RG Werner, K Kopp, M Schlueter (2007) Glycosylation of therapeutic proteins in different production systems. *Acta Paediatr* 96: 17-22.
- [45] AR Costa, ME Rodrigues, M Henriques, y col. (2013) Glycosylation : impact , control and improvement during therapeutic protein production. *Crit Rev*

- Biotechnol* 8551: 1-19.
- [46] M Butler (2006) Optimisation of the cellular metabolism of glycosylation for recombinant proteins produced by mammalian cell systems. *Cytotechnology* 50: 57-76.
- [47] E Higgins (2010) Carbohydrate analysis throughout the development of a protein therapeutic. *Glycoconj J* 27: 211-225.
- [48] P Hossler, F K Sarwat, J L Zheng (2009) Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. *Glycoconj* 19: 936-949.
- [49] J Dumont, D Eewart, B Mei, y col. (2016) Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Crit Rev Biotechnol* 36: 1110-1122.
- [50] ML Lipscomb, LA Palomares, V Hernández, y col. (2005) Effect of production method and gene amplification on the glycosylation pattern of a secreted reporter protein in CHO cells. *Biotechnol Prog* 21: 40-49.
- [51] M Vellard (2003) The enzyme as drug: application of enzymes as pharmaceuticals. *Curr Opin Biotechnol* 14: 444-450.
- [52] M Solomon, S Muro (2017) Lysosomal Enzyme Replacement Therapies: Historical Development, Clinical Outcomes, and Future Perspectives Melani. *Adv Drug Deliv Rev* 118: 109-134.
- [53] E Tambuyzer (2010) Rare diseases, orphan drugs and their regulation: questions and misconceptions. *Nat Rev Drug Discov* 9: 921-9.
- [54] HAD Lagassé, A Alexaki, VL Simhadri, y col. (2017) Recent advances in (therapeutic protein) drug development [version 1; referees: 2 approved]. *F1000Research* 2017 6: 1-7.
- [55] M Manzolido (2013) Incentivos para el desarrollo, registro y comercialización de medicamentos para enfermedades serias o poco frecuentes en la Argentina. *Centro de Documentación de la Universidad Isalud*, p. 53-64.
- [56] AMIFE (Asociación de medicina de la industria farmacéutica) (2016) *Medicamentos huerfanos: no hay que confundir designación con autorización*. <http://amife.net/blog/medicamentos-huerfanos-no-hay-que-confundir-designacion-con-autorizacion/>. 3 de noviembre de 2017.
- [57] T Kirkegaard (2013) Emerging therapies and therapeutic concepts for lysosomal storage diseases. *Expert Opin Orphan Drugs* 1: 385-404.
- [58] WR Wilcox, M Banikazemi, N Guffon, y col (2004) Long-term safety and efficacy of enzyme replacement therapy for Fabry disease. *Am J Hum Genet* 75: 65-74.
- [59] T Braulke, JS Bonifacino (2009) Biochimica et Biophysica Acta Sorting of lysosomal proteins. *BBA - Mol Cell Res* 1793: 605-614.

- [60] AJ Espejo-Mojica, CJ Alméciga-Díaz, A Rodríguez, y col. (2015) Human recombinant lysosomal enzymes produced in microorganisms. *Mol Genet Metab* 116: 13-23.
- [61] WR Wilcox (2004) Lysosomal storage disorders: The need for better pediatric recognition and comprehensive care. *J Pediatr* 144: S3-S14.
- [62] T Prabakaran, R Nielsen, JV Larsen, y col. (2011) Receptor-mediated endocytosis of alpha-galactosidase a in human podocytes in Fabry disease. *PLoS One* 6: 1-11.
- [63] YA Ioannou, DF Bishop, RJ Desnick (1992) Overexpression of human a-galactosidase A results in its intracellular aggregation, crystallization in lysosomes, and selective secretion. *J Cell Biol* 119: 1137-1150.
- [64] A Pisani, B Visciano, GD Roux, y col. (2012) Enzyme replacement therapy in patients with Fabry disease: state of the art and review of the literature. *Mol Genet Metab* 107: 267-75.
- [65] PA Rozenfeld, R Ceci, N Roa, y col. (2015) The Continuous Challenge of Diagnosing patients with Fabry disease in Argentina : Genotype , Experiences , Anecdotes , and New Learnings. *J Inborn Errors Metab Screen is* 3: 1-7.
- [66] MD Sanchez-Niño, A Ortiz (2016) Enzyme Replacement Therapy for Fabry Disease. *J Inborn Errors Metab* 4: 1-7.
- [67] R Schiffmann (2009) Fabry disease. *Pharmacol Ther* 122: 65-77.
- [68] NA Chamoles, MB D. Gaggioli (2001) Fabry disease: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta* 195-196.
- [69] PA Rozenfeld (2016) Enfermedad de Fabry en Argentina. *Acta Bioquímica Clínica Latinoam* 50: 17-25.
- [70] B Winchester, E Young (2006) Chapter 18: Biochemical and genetic diagnosis of Fabry disease. *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*. PharmaGenesis O, Oxford, p. 1-18., E Young E. Chapter 18: Biochemical and genetic diagnosis of Fabry disease. En: PharmaGenesis O (ed) *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*. Oxford, 2006, pp. 1-18.
- [71] T Tsukimura, S Nakano, T Togawa, y col. (2014) Plasma mutant α -galactosidase A protein and globotriaosylsphingosine level in Fabry disease. *Mol Genet Metab Reports* 1: 288-298.
- [72] Y Sugimoto, I Aksentijevich, R Brady, y col. (1995) Retroviral Coexpression of a Multidrug Resistance Gene (MDRI) and Human alpha a lactosidase A for Gene Therapy of Fabry Disease. *Hum Gene Ther* 6: 905-915.
- [73] SC Jung, IP Han, A Limalye, y col. (2001) Adeno-associated viral vector-mediated gene transfer results in long-term enzymatic and functional correction

- in multiple organs of Fabry mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 2676-2681.
- [74] H Takahashi, Y Hirai, M Migita, y col. (2002) Long-term systemic therapy of Fabry disease in a knockout mouse by adeno-associated virus-mediated muscle-directed gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 13777-13782.
- [75] M Yoshimitsu, T Sato, K Tao, y col (2004) Bioluminescent imaging of a marking transgene and correction of Fabry mice by neonatal injection of recombinant lentiviral vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 16909-16914.
- [76] M Przybylska, I-H Wu, H Zhao, y col. (2004) Partial correction of the alpha-galactosidase A deficiency and reduction of glycolipid storage in Fabry mice using synthetic vectors. *J Gene Med* 6: 85-92.
- [77] M Beck (2010) Therapy for Lysosomal Storage Disorders. *Life* 62: 33-40.
- [78] A Abe, S Gregory, L Lee, y col. (2000) Reduction of globotriaosylceramide in Fabry disease mice by substrate deprivation. *J Clin Invest* 105: 1563-1571.
- [79] T Okumiya, S Ishii, T Takenaka, y col. (1995) Galactose stabilizes various missense mutants of alpha-Galactosidase in fabry disease. *Biochem Biophys Res Commun* 214: 1219-1224.
- [80] DA Hughes, K Nicholls, SP Shankar, y col. (2017) Oral pharmacological chaperone migalastat compared with enzyme replacement therapy in Fabry disease: 18-month results from the randomised phase III ATTRACT study. *J Med Genet* 54: 288-296.
- [81] M Abaoui, M Boutin, P Lavoie, y col. (2016) Tandem mass spectrometry multiplex analysis of methylated and non-methylated urinary Gb3 isoforms in Fabry disease patients. *Clin Chim Acta* 452: 191-198.
- [82] K Lee, X Jin, K Zhang, y col. (2003) A biochemical and pharmacological comparison of enzyme replacement therapies for the glycolipid storage disorder Fabry disease. *Glycobiology* 13: 305-313.
- [83] H Sakuraba, M Murata-Ohsawa, I Kawashima, y col. (2006) Comparison of the effects of agalsidase alfa and agalsidase beta on cultured human Fabry fibroblasts and Fabry mice. *J Hum Genet* 51: 180-188.
- [84] RJ Desnick (2004) Enzyme replacement therapy for Fabry disease: lessons from two alpha-galactosidase A orphan products and one FDA approval. *Expert Opin Biol Ther* 4: 1167-1176.
- [85] S Xu, Y Lun, N Brignol, y col. (2015) Coformulation of a Novel Human α - Galactosidase A With the Pharmacological Chaperone AT1001 Leads to Improved Substrate Reduction in Fabry Mice. *Mol Ther* 23: 1169-1181.
- [86] J Keslová-Veselíková, H Hůlková, R Dobrovolný, y col. (2008) Replacement of α -galactosidase A in Fabry disease: Effect on fibroblast cultures compared with

- biopsied tissues of treated patients. *Virchows Arch* 452: 651-665.
- [87] S Jaurretche, N Antongiovanni, F Perretta (2017) *Prevalence of chronic kidney disease in fabry disease patients : Multicenter cross sectional study in Argentina. Mol Genet Metab Reports* 12: 41-43.
- [88] A Mehta (2015) Fabry disease : a review of current enzyme replacement strategies. *Expert Opin Orphan Drugs* 3: 1319-1330.
- [89] DP Germain, J Charrow, RJ Desnick, y col. (2015) Ten-year outcome of enzyme replacement therapy with agalsidase beta in patients with Fabry disease. *J Med Genet* 52: 353-358.
- [90] GE Linthorst, CEM Hollak, WE Donker-Koopman, y col. (2004) Enzyme therapy for Fabry disease: Neutralizing antibodies toward agalsidase alpha and beta. *Kidney Int* 66: 1589-1595.
- [91] SM Rombach, JMFG Aerts, BJHM Poorthuis, y col. (2012) Long-Term Effect of Antibodies against Infused Alpha-Galactosidase A in Fabry Disease on Plasma and Urinary (lyso)Gb3 Reduction and Treatment Outcome. *PLoS One* 7: 1-9.
- [92] WR Wilcox, GE Linthorst, DP Germain, y col. (2012) Anti- α -galactosidase A antibody response to agalsidase beta treatment: Data from the Fabry Registry. *Mol Genet Metab* 105: 443-449.
- [93] PN Francesco De, JM Mucci, R Ceci, y col. (2013) Fabry disease peripheral blood immune cells release in inflammatory cytokines: Role of globotriaosylceramide. *Mol Genet Metab* 109: 93-99.
- [94] SC Garman, DN Garboczi (2004) The molecular defect leading to Fabry disease: structure of human alpha-galactosidase. *J Mol Biol* 337: 319-35.
- [95] RJ Desnick, KJ Deant, G Grabowski, y col. (1979) Enzyme therapy in Fabry disease : Differential in vivo plasma clearance and metabolic effectiveness of plasma and splenic α -galactosidase A isozymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 5326-5330.
- [96] JL Corchero, R Mendoza, J Lorenzo, y col. (2011) Integrated approach to produce a recombinant, His-tagged human α -galactosidase A in mammalian cells. *Biotechnol Prog* 27: 1206-1217.
- [97] DF Bishop, RJ Desnick (1981) Affinity purification of alpha-galactosidase A from human spleen, placenta, and plasma with elimination of pyrogen contamination. Properties of the purified splenic enzyme compared to other forms. *J Biol Chem* 256: 1307-1316.
- [98] PA Hantzopoulos, DH Calhoun (1987) Expression of the human alpha-galactosidase A in Escherichia coli K-12. *Gene* 57: 159-169.
- [99] U Unzueta, F Vázquez, G Accardi, y col. (2015) Strategies for the production of

- difficult-to-express full-length eukaryotic proteins using microbial cell factories : production of human alpha-galactosidase A. *Appl Microbiol Biotechnol* 99: 5853-5874.
- [100] Y Chiba, H Sakuraba, M Kotani, y col. (2002) Production in yeast of α -galactosidase A , a lysosomal enzyme applicable to enzyme replacement therapy for Fabry disease 12: 821-828.
- [101] Y Chen, M Jin, T Egborge, y col. (2000) Expression and Characterization of Glycosylated and Catalytically Active Recombinant Human alpha-Galactosidase A Produced in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 20: 472-484.
- [102] Y Chen, M Jin, L Goodrich, y col. (2000a) Purification and Characterization of Human alpha-Galactosidase A Expressed in Insect Cells Using a Baculovirus Vector. *Protein Expr Purif* 20: 228-236.
- [103] J Shen, A Busch, TS Day, y col. (2016) Mannose receptor-mediated delivery of moss-made α -galactosidase A efficiently corrects enzyme deficiency in Fabry mice. *J Inherit Metab Dis* 39: 293-303.
- [104] RJ Desnick, YA Ioannou, CM Eng. Part 4: Lysosomal Disorders. 150: α -Galactosidase A Deficiency: Fabry Disease, (Ed: David Valle), p. 1-43..
- [105] Y Sohn, JM Lee, H Park, y col. (2013) Enhanced sialylation and in vivo efficacy of recombinant human α -galactosidase through in vitro glycosylation. *BMB Rep* 46: 157-162.
- [106] B Gaillet, R Gilbert, S Broussau, y col. (2010) High-level recombinant protein production in CHO cells using lentiviral vectors and the cumate gene-switch. *Biotechnol Bioeng* 106: 203-215.
- [107] F Matsuura, M Ohta, YA Ioannou, y col. (1998) Human alpha-galactosidase A: Characterization of the N-linked oligosaccharides on the intracellular and secreted glycoforms overexpressed by Chinese hamster ovary cells. *Glycobiology* 8: 329-339.
- [108] H Block, J Kubicek, U Roth, y col. (2008) Production and comprehensive quality control of recombinant human Interleukin-1 b : A case study for a process development strategy 57: 244-254.
- [109] WHO (2013) Guidelines on the quality , safety , and efficacy of biotherapeutic protein products prepared by recombinant DNA technology Replacement of Annex 3 of WHO Technical Report Series. WHO Press, Geneva.
- [110] Danzer, LA Currie (1998) Guidelines for calibration in analytical chemistry part 1. fundamentals and single component calibration. *Pure Appl Chem* 70: 993-1014.
- [111] Q Zhou, J Kyazike, T Edmunds, y col. (2002) Mannose 6-phosphate quantitation in glycoproteins using high-pH anion-exchange chromatography with pulsed

- amperometric detection. *Anal Biochem* 306: 163-170.
- [112] L Gilda, T Peraza, L Ibis, y col. (2005) Validación de un ensayo tipo ELISA para la cuantificación de anticuerpos contra el polisacárido capsular de *Haemophilus influenzae* tipo b. *Rev Cubana Med Trop*; 57 (3): 8-19.
- [113] N Dadehbeigi, AJ Dickson (2015) Chemical manipulation of the mTORC1 pathway in industrially relevant CHOK1 cells enhances production of therapeutic proteins. *Biotechnol J* 10: 1041-1050.
- [114] L Chu, DK Robinson (2001) Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. *Curr Opin Biotechnol* 12: 180-187.
- [115] C Prieto, D Fontana, M Etcheverrigaray, y col. (2011) A strategy to obtain recombinant cell lines with high expression levels. Lentiviral vector-mediated transgenesis. *BMC Proc* 5: 7.
- [116] M Schneider, IW Marison, U Von Stockar (1996) The importance of ammonia in mammalian cell culture. *J Biotechnol* 46: 161-185.
- [117] L Zhang, H Shen, Y Zhang (2004) Fed-batch culture of hybridoma cells in serum-free medium using an optimized feeding strategy. *J Chem Technol Biotechnol* 79: 171-181.
- [118] AS Rathore (2009) Follow-on protein products : scientific issues , developments and challenges. *Cell Press* 27: 698-705.
- [119] M Saraswat, L Musante, A Ravidá, y col. (2013) Preparative Purification of Recombinant Proteins : Current Status and Future Trends. *Biomed Res Int* 1-18.
- [120] B K Nfor, T Ahamed, GWK Van Dedem, y col. (2008) Design strategies for integrated protein purification processes : challenges , progress and outlook. *J Chem Technol Biotechnol* 83: 124-132.
- [121] MD Argentine, PK Owens, BA Olsen (2007) Strategies for the investigation and control of process-related impurities in drug substances. *Adv Drug Deliv Rev* 59: 12-28.
- [122] DSC Bracewell (2013) The challenges of product- and process-related impurities to an evolving biopharmaceutical industry. *Bioanalysis* 5: 123-126.
- [123] K Yasuda, H-H Chang, H-L Wu, y col. (2004) Efficient and rapid purification of recombinant human alpha-galactosidase A by affinity column chromatography. *Protein Expr Purif* 37: 499-506.
- [124] Y Berthois, JA Katzenellenbogen, BS Katzenellenbogen (1986) Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc Natl Acad Sci* 83: 2496-2500.
- [125] WV Welshons, MF Wolf, CS Murphy, y col. (1988) Estrogenic activity of phenol red. *Mol Cell Endocrinol* 57: 169-178.

- [126] Kumar, N Punekar (2014) High-Throughput Screening of Dye-Ligands for Chromatography. Protein Downstream Processing. Ed:Labrou NE. Humana Press, Totowa, NJ, p. 53-65.
- [127] FP Byrne, S Jin, G Paggiola, y col. (2016) Tools and techniques for solvent selection : green solvent selection guides. *Sustain Chem Process* 4: 1-24.
- [128] JT McCue (2009) Chapter 25 Theory and Use of Hydrophobic Interaction Chromatography in Protein Purification Applications. *Methods in Enzymology*. Ed: Burgess R, Deutscher MP. Elsevier Inc., p. 405-414.
- [129] RF Selden, M Borowski, CM Kinoshita, DA Treco, MD Williams, TJ Schuetz, PF Daniel (2000) WO 00/53730 A3, US, 2000.
- [130] N Miyamura, E Araki, K Matsuda, y col. (1996) A Carboxy-terminal Truncation of Human α -Galactosidase A in a Heterozygous Female with Fabry Disease and Modification of the Enzymatic Activity by the Carboxy-terminal Domain. *J Clin Invest* 98: 1809-1817.
- [131] Z Kálmán-szekeres, M Olajos, K Ganzler (2012) Analytical aspects of biosimilarity issues of protein drugs. *J Pharm Biomed Anal* 69: 185-195.
- [132] JD Houde, AS Berkowitz (2015) Biophysical characterization of proteins in developing biopharmaceuticals. Elsevier, Amsterdam, p. 1-401.
- [133] B Petersen, T Petersen, P Andersen, y col. (2009) A generic method for assignment of reliability scores applied to solvent accessibility predictions. *BMC Struct Biol*; 9: 51.
- [134] AK Kakkar, N Dahiya (2014) The evolving drug development landscape: From blockbusters to niche busters in the orphan drug space. *Drug Dev Res* 75: 231-234.
- [135] I Cabrera, I Abasolo, JL Corchero, y col. (2016) α -Galactosidase-A-Loaded Nanoliposomes with Enhanced Enzymatic Activity and Intracellular Penetration. *Adv Healthc Mater* 5: 829-840.
- [136] F Zhang, M Liu, H Wan, y col. (2015) Discussion about Several Potential Drawbacks of PEGylated Therapeutic Proteins. *Biol Pharm Bull* 37: 335-339.
- [137] JK Dozier, MD Distefano (2015) Site-Specific PEGylation of Therapeutic Proteins. *Int J Mol Sci* 16: 25831-25864.
- [138] C Plewa (2010) Application of Lentiviral Vectors for Development of Production Cell Lines and Safety Testing of Lentiviral-Derived Cells or Products. *PDA J Pharm Sci Technol* 64: 386-391.
- [139] N Ceaglio, M Etcheverrigaray, HS Conradt, y col. (2010) Highly glycosylated human alpha interferon: An insight into a new therapeutic candidate. *J Biotechnol* 146: 74-83.

- [140] N Ceaglio, A Gugliotta, MB Tardivo, y col. (2016) Improvement of in vitro stability and pharmacokinetics of hIFN- α by fusing the carboxyl-terminal peptide of hCG β -subunit. *J Biotechnol* 221: 13-24.
- [141] J-Y Kang, O Kwon, JY Gil, y col. (2016) Comparison of fluorescent tags for analysis of mannose-6-phosphate glycans. *Anal Biochem* 501: 1-3.
- [142] I Mahmood, MD Green (2005) Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations in the development of therapeutic proteins. *Clin Pharmacokinet* 44: 331-347.
- [143] WR Strohl (2015) Fusion Proteins for Half-Life Extension of Biologics as a Strategy to Make Biobetters. *BioDrugs* 29: 215-239.
- [144] FM Wurm, JM Wurm (2017) Cloning of CHO Cells , Productivity and Genetic Stability — A Discussion. *Processes* 5: 1-13.