

Universidad de Concepción  
Dirección de PostGrado  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Programa de Magíster en Bioquímica y Bionformática



**"Expresión de una variante quimérica de eritropoyetina humana en la glándula mamaria como sistema productivo de proteínas recombinantes"**

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN BIOQUÍMICA Y  
BIOINFORMÁTICA

EMILIO ROMUALDO SALGADO ROJAS  
CONCEPCIÓN CHILE  
2016

**Profesor Tutor:** Dr. Jorge Roberto Toledo Alonso  
Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos  
Departamento de Fisiopatología  
Facultad de Ciencias Biológicas

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Fisiopatología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

---

**Dr. Jorge Roberto Toledo Alonso**

Profesor Tutor  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

**Dra. Raquel Montesino Segui**

Profesora Co-Tutora  
Facultad de Ciencias Biológicas



---

**Dra. Lleretny Rodríguez Álvarez**

Profesora Evaluadora  
Facultad de Ciencias Veterinarias

---

**Dra. Violeta Morin Muñoz**

Directora  
Programa Magister Bioquímica y Bionformática  
Facultad de Ciencias Biológicas

Tesis de postgrado para postular al grado de Magister en Bioquímica y Bionformática.

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Fisiopatología de la Universidad de Concepción, en el Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos, dirigida por el Dr. Jorge Roberto Toledo Alonso. Además, fue financiada por el siguiente proyecto:

Proyecto Fondef D09i1262. Innovar en la tecnología de proceso para la producción de proteínas recombinantes complejas en la leche de mamíferos no transgénicos. Producción de eritropoyetina humana recombinante para su uso como biofármaco.

Agradecimientos a CONICYT por financiar la estancia en el programa de Magister en Ciencias, mención Bioquímica y Bioinformática, con la adjudicación de la beca nacional de Magister durante los años 2013-2014.



## TABLA DE CONTENIDO

<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>v</b>
<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	<b>vii</b>
<b>INDICE DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>ix</b>
<b>SUMARY</b> .....	<b>xi</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>5</b>
<b>II. 1. Expresión de proteínas recombinantes</b> .....	<b>5</b>
II. 1. 1. Expresión de proteínas recombinantes en procariontes .....	6
II. 1. 2. Expresión de proteínas recombinantes en eucariontes inferiores .....	7
II. 1. 3. Plantas como biorreactores para la expresión de proteínas recombinantes .....	8
II. 1. 4. Expresión de proteínas en cultivos celulares de mamíferos .....	9
<b>II. 2. Animales como biorreactores</b> .....	<b>11</b>
II. 2. 1. Expresión de proteínas recombinantes en la glándula mamaria .....	12
II. 2. 1. 1. La glándula mamaria .....	12
II. 2. 1. 2. Transgénesis aplicada a la glándula mamaria .....	14
II. 2. 1. 3. Transferencia génica .....	16
II. 2. 1. 4. Modificación genética <i>in situ</i> del epitelio glandular mamario .....	21
<b>II. 3. Glicosilación</b> .....	<b>24</b>
II. 3. 1. N-glicosilación .....	26
<b>II. 4. Adenovirus</b> .....	<b>30</b>
II. 4. 1. Clasificación .....	30
II. 4. 2. Estructura .....	30
II. 4. 3. Organización del genoma .....	31
II. 4. 4. Ciclo replicativo de los adenovirus .....	33
II. 4. 5. Activación de genes tempranos .....	35
II. 4. 6. Replicación del ADN adenoviral .....	35
II. 4. 7. Activación de genes tardíos .....	36
II. 4. 8. Encapsidación y salida de la célula infectada .....	36
II. 4. 9. Vectores adenovirales recombinantes .....	37
II. 4. 9. 1. Vectores adenovirales de primera generación .....	38

II. 4. 9. 2. Vectores adenovirales de segunda generación .....	39
II. 4. 9. 3. Vectores adenovirales vacíos .....	40
<b>II. 5. La eritropoyetina humana .....</b>	<b>40</b>
II. 5. 1. Relación entre la actividad biológica y la glicosilación .....	42
<b>II.6. Proteínas de Fusión y su uso como biofármacos .....</b>	<b>45</b>
II.6.1. Diseño de secuencias espaciadores .....	45
II.6.2. Proteínas de Fusión-Fc .....	46
<b>II.7. HIPOTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>50</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>51</b>
<b>III.1. MATERIALES .....</b>	<b>51</b>
<b>III. 1.1. Cepas bacterianas .....</b>	<b>51</b>
<b>III. 1.2. Líneas celulares .....</b>	<b>51</b>
<b>III. 1.3. Animales .....</b>	<b>52</b>
<b>III. 1.4. Medios de cultivo .....</b>	<b>52</b>
III.1.4.1. Medio para el cultivo de bacterias .....	52
III.1.4.2. Medios para el cultivo de células de mamíferos .....	53
<b>III.1.5 Plasmidios .....</b>	<b>53</b>
<b>III.1.6. Enzimas, proteínas de referencia y anticuerpos .....</b>	<b>54</b>
<b>III.1.7. Soluciones .....</b>	<b>54</b>
<b>III. 2. MÉTODOS .....</b>	<b>55</b>
<b>III.2.1. Técnicas básicas de genética molecular .....</b>	<b>55</b>
<b>III.2.2. Transformación de <i>Escherichia coli</i> .....</b>	<b>56</b>
<b>III.2.3. Aislamiento de ADN plasmídico .....</b>	<b>56</b>
<b>III.2.4. Técnicas básicas para el cultivo de células de mamífero .....</b>	<b>56</b>
III.2.4.1. Descongelación .....	56
III.2.4.2 Cambio de Medio .....	57
III.2.4.3. Propagación .....	57
III.2.4.4. Conteo de células viables .....	58
III.2.4.5. Congelación .....	58
III.2.4.6. Transfección en cultivos celulares .....	58
<b>III.2.5. Generación de vectores adenovirales con la variante EPO-Fc .....</b>	<b>59</b>
III.2.5.1. Clonación del gen EPO-Fc en el vector pAdTrack-CMV .....	59
III.2.5.2. Generación de los genomas adenovirales por recombinación homóloga .....	60

III.2.5.3. Generación de los viriones adenovirales AdEPO-Fc.....	60
III.2.5.4. Amplificación de los vectores adenovirales.....	61
III.2.5.5. Titulación de los vectores adenovirales.....	61
<b>III.2.6. Transducción adenoviral en cultivos celulares de mamíferos.....</b>	<b>62</b>
III. 2.6.1. Selección de la multiplicidad de infección en GMEC y SIHA.....	62
III. 2.6.2 Expresión de proteínas recombinantes en cultivos celulares mediada por vectores adenovirales .....	62
<b>III. 2.7. Expresión de la proteína EPO-Fc en la leche de cabra.....</b>	<b>63</b>
III.2.7.1. Inducción de lactación en cabra.....	63
III.2.7.2. Infusión adenoviral en la glándula mamaria de cabra.....	63
III.2.7.3. Tratamiento de la leche.....	64
<b>III. 2.8. Técnicas de manipulación e identificación de proteínas.....</b>	<b>64</b>
III.2.8.1. Precipitación de proteínas por TCA-deoxicolato de sodio.....	64
III.2.8.2. Electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida.....	65
III.2.8.3. Electrotransferencia de proteínas.....	65
III.2.8.4 Identificación de proteínas mediante "Western blot".....	65
III.2.8.5. Cuantificación de EPO-Fc utilizando ELISA sándwich .....	66
<b>III. 2.9. Purificación de EPO-Fc expresada en medio de cultivo de células SiHa y leche de cabra.....</b>	<b>67</b>
<b>III.2.10. Actividad hematopoyética <i>in vivo</i> de la EPO-Fc recombinante.....</b>	<b>67</b>
III. 2.10.1. Determinación de la dosis efectiva de EPO-Fc en modelos murinos.....	67
III. 2.10.2. Ensayo de actividad hematopoyética en modelos murinos.....	68
III. 2.10.3. Análisis estadístico .....	69
III. 2.10.4. Manipulación de animales .....	69
III. 2.10.5. Desglicosilación con la enzima PNGasa F .....	69
III. 2.10.6. Extracción de oligosacáridos .....	70
III. 2.10.7. Reacción de derivatización de oligosacáridos con 2-AB .....	70
III. 2.10.8. HPLC en fase normal .....	71
III. 2.10.9. WAX-HPLX.....	71
<b>IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>73</b>
IV.1. Diseño de la variante dimérica de eritropoyetina, EPO-Fc.....	73
IV.2. Generación del vector adenoviral AdEPO-Fc.....	75

IV.3.Ensayos de transducción adenoviral en cultivos de GMEC.....	79
IV.4.Expresión de la proteína de fusión EPO-Fc en células SiHa.....	80
IV.5.Transducción de la glándula mamaria de cabra con el vector AdEPO-Fc....	83
IV.6.Purificación de la proteína de fusión EPO-Fc expresada <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> ....	85
IV.7.Actividad hematopoyética <i>in vivo</i> de la proteína EPO-Fc expresada en leche de cabras.....	87
IV.8.Análisis del perfil de oligosacáridos N-enlazados a EPO-Fc.....	90
IV.9.Perfil de isoformas de los oligosacáridos N-enlazados a la EPO-Fc .....	91
IV.10.Análisis de actividad hematopoyética de variantes deglicosiladas de EPO-Fc.....	94
<b>V. DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>99</b>
<b>VI.CONCLUSIONES.....</b>	<b>104</b>
<b>VII.PROYECCIONES.....</b>	<b>105</b>
<b>VIII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>106</b>



## INDICE DE FIGURAS

<b>Fig.1.</b> Características morfológicas de la glándula mamaria.....	9
<b>Fig.2.</b> Estructuras probables de oligosacáridos N-enlazados.....	29
<b>Fig.3.</b> Estructura del adenovirus humano serotipo 5 .....	32
<b>Fig.4.</b> Estructura primaria de la Eritropoyetina humana.....	43
<b>Fig.5.</b> Variante dimérica de hEPO.....	74
<b>Fig.6.</b> Clonamiento del vector pAdTrackEPO-Fc y obtención del vector pAdEPO-Fc por vía de recombinación de homólogos.....	76
<b>Fig.7.</b> Diagrama representativo de los pasos de clonación para la generación del vector adenoviral AdEPO-Fc.....	77
<b>Fig.8.</b> Generación y amplificación de los vectores adenovirales AdEPO-Fc en la línea de empaquetamiento HEK-293A .....	78
<b>Fig.9.</b> Transducción adenoviral de cultivos de células humanas y GMEC.....	80
<b>Fig.10.</b> Expresión de la proteína EPO-Fc y GFP a las 96h post-transducción adenoviral en células SiHa .....	81
<b>Fig.11.</b> Análisis en SDS-PAGE 10%, tinción con azul de Coomassie y Western blot con un anticuerpo monoclonal $\alpha$ hEPO.....	82
<b>Fig.12.</b> Cinética de expresión de EPO-Fc en leche de cabras transducidas con el AdEPO-Fc.....	83
<b>Fig.13.</b> Purificación de EPO-Fc a partir de células SIHA y de leche de cabra .....	86
<b>Fig.14.</b> Curva Dosis-respuesta para EPO-Fc.....	87
<b>Fig.15.</b> Actividad hematopoyética <i>in vivo</i> de la EPO-Fc expresada en células SiHa y en la glándula mamaria de cabra.....	89
<b>Fig.16.</b> Ensayo de N-desglicosilación de EPO-Fc con <i>PNGasa F</i> .....	91
<b>Fig.17.</b> Perfil de glicanos N-enlazados de EPO-Fc recombinante expresada en células SiHa y leche de cabra.....	93



**Fig.18.** Ensayo de N-desglicosilación de EPO-Fc con *PNGasa* F en condiciones reductoras y no reductoras.....94

**Fig.19.** Actividad hematopoyética *in vivo* de variantes de EPO-Fc desglicosiladas.....96

**Fig.20.** Patrones de N-glicosilación asociados a las variantes de hEPO.....97



## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla .1.</b> Proteínas humanas de interés biofarmacéutico expresadas en la leche de mamíferos transgénicos.....	12
<b>Tabla .2.</b> Cronología de la producción de proteínas recombinantes en la Glándula mamaria de líneas transgénicas en diferentes especies de mamíferos.....	15
<b>Tabla .3.</b> Proteínas adenovirales y su función .....	29
<b>Tabla .4.</b> Proteínas de fusión aprobadas para su uso terapéutico.....	47



## INDICE DE ABREVIATURAS

Ad	Adenovirus
cADN	ADN complementario
Amp	Ampicilina
mARN	Ácido ribonucleico mensajero
ATh	Antitrombina humana
CAR	Receptor de coxsackievirus y adenovirus
CHO	Células de ovario de hámster chino
DMB	1,2-diamino-4,5-metilen-dioxibenzeno
hEPO	Eritropoyetina humana
GFP	Proteína verde fluorescente, del inglés “green fluorescent protein”
Glc	Glucosa
GlcNAc	N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina
GalNac	N-acetil- $\beta$ -D-galactosamina
GM	Glándula mamaria
GMEC	Células epiteliales mamarias de cabra
HEK-293	Células de riñón humano embrionario
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
HRP	Peroxidasa de rábano picante, del inglés “horseradish peroxidase”
Kan	Kanamicina
Kb	Kilopares de bases
Man	Manosa
MOI	Multiplicidad de infección, del inglés “multiplicity of infection”
nt	Nucleótidos
pb	Pares de bases
RE	Retículo endoplasmático
SDS-PAGE	Electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio.
SiHa	Células de cáncer cérvico uterino humanas
UFC	Unidades formadoras de color

## RESUMEN

Las proteínas recombinantes de estructura compleja con aplicación biofarmacéutica deben producirse mayoritariamente en cultivos artificiales de tejidos, para obtener moléculas biológicamente activas. Por tanto, actualmente se utilizan sistemas de expresión de alto costo y técnicamente exigentes. Un caso particular de estos biofármacos es la producción de eritropoyetina humana recombinante, que se utiliza ampliamente a nivel mundial como terapia contra patologías como insuficiencia renal crónica, anemia aplásica, y además como complemento en terapias para enfermedades de alta incidencia, como el cáncer y el SIDA. En el presente estudio, se evidencia la relación entre la actividad biológica *in vivo* de la EPO humana recombinante y las cadenas N-glicosídicas enlazadas a la molécula, las cuales difieren según el sistema de expresión utilizado en su proceso de producción. Los resultados obtenidos confirman que la transducción directa de las células secretoras mamarias con vector adenoviral es una metodología sólida para obtener niveles de hasta 3 mg/ml de la variante de EPO quimérico (EPO-Fc) de forma soluble. Los ensayos de expresión de esta glicoproteína quimérica en un sistema de cultivo de células de mamífero, demostraron que la variante EPO-Fc potencia significativamente su actividad biológica *in vivo* en comparación al monómero de eritropoyetina comercial. Sin embargo, la actividad hematopoyética de EPO-Fc resultó significativamente menor cuando se expresa en la glándula mamaria de cabra. Además, en el presente estudio se observó que la disminución de la actividad biológica se encuentra directamente relacionada con un bajo contenido de ácido siálico en las cadenas de N-glicanos enlazadas a la EPO-Fc expresada en la leche. En contraste, la proteína EPO-Fc expresada en cultivos celulares de mamífero mostró una población abundante de N-glicanos con estructuras complejas de múlti-sialiladas (34%), mientras que glicanos Mono-sialilados fueron las principales estructuras cargadas vinculados a la EPO-Fc expresada en las células epiteliales mamarias de cabras transducidas utilizando vectores adenovirales. Los resultados obtenidos

sugieren que las estructuras oligosacáridas N-enlazadas poseen un impacto incluso mayor en la vida media *in vivo* de la eritropoyetina humana, que el peso molecular de la proteína recombinante.



## SUMMARY

Recombinant proteins with complex structures used in biopharmaceutical application, must be necessarily produced in artificially cultured tissues to obtain biologically active molecules. A well known example of these bio-drugs, is the production of recombinant human erythropoietin (rhEPO), which is widely used as a therapy against diseases such as chronic kidney disease, aplastic anemia, cancer and AIDS. Current rhEPO production systems are based on cell cultures, which render a drug, with low therapeutic potential that has to be enriched of its highly sialylated isoforms to be biologically active. Unfortunately, this expression approach is both expensive and technically demanding, and leads to high production and retail costs.

In the present study, we report the close relationship between the *in vivo* biological activity and glycosylation processing of recombinant human EPO, which is dependent on the expression system used in its production process. Our results confirm that the direct transduction of the mammary secretory cells with adenoviral vector is a robust methodology to obtain high levels (up to 3 mg/mL) of the chimeric EPO variant (EPO-Fc) while expression of this chimeric glycoprotein in a mammalian cell culture system enhanced its *in vivo* biological activity compared to a commercial counterpart. However, the hematopoietic activity was significant lower when the EPO-Fc was expressed in goat mammary gland. This low biological activity was related to the low sialylation of the glycan chains linked on the milk-derived hEPO-Fc. The glycan population of mammalian cell-derived EPO-Fc showed a relatively higher abundance of multi-sialylated complex structures (34%), while, neither the tetra-sialylated nor tri-sialylated glycoforms were synthesized in the milk-derived EPO-Fc chimeric hormone. Mono-sialylated glycans were the major charged structures linked to the EPO-Fc obtained via the adenoviral-transduced goat mammary epithelial cells. This result strongly suggests that the carbohydrate content is more important in influencing the *in vivo* half-life of EPO than the molecular weight of the recombinant protein.

## I. INTRODUCCION

La producción de proteínas recombinantes como biofármacos, en conjunto con la tecnología del ADN recombinante se ha establecido como un proceso eficiente y seguro para su aplicación clínica en diversas patologías emergentes o en aquellas que carecían de un tratamiento adecuado. Lo cierto es que desde hace casi 30 años se utilizan estas proteínas en el tratamiento de diversas enfermedades y hoy en día ya son alrededor de 30 las proteínas recombinantes que se comercializan en el mercado, junto con 120 fármacos recombinantes que se han aprobado para su uso clínico (Peakmany cols., 1998; Reichert y cols., 2003).

Los sistemas de expresión recombinantes existentes varían de acuerdo a la complejidad de la proteína de interés. Estos abarcan organismos hospederos utilizados frecuentemente tales como bacterias y levaduras (Panda y cols., 2013; Porro y cols., 2013). Ambos sistemas basados en organismos unicelulares permiten una elevada expresión a bajos costos. Sin embargo, en muchas ocasiones la actividad biológica de dichas proteínas se ve alterada debido al inadecuado procesamiento post-traducciona en estos sistemas de expresión (Dingermann, 2008 ; Rosenberger y cols., 1994; Simmons y cols., 1996). Por esta causa la producción de un gran número de biofármacos proteicos requiere de la maquinaria biosintética de células eucarióticas superiores (Aricescu y cols, 2013; Werner y col., 1998).

Un ejemplo de esto, son las proteínas recombinantes estructuralmente complejas las cuales requieren sistemas de expresión basados en cultivos de células de mamíferos, puesto que estos son capaces de realizar las modificaciones post-traduccionales requeridas en la proteína sintetizada, y que son determinantes para una adecuada fármaco-cinética y actividad biológica (Jelkmann, 2003; Wernery cols., 1998; Rosenberger y cols., 1994). Dentro de estas modificaciones post-traduccionales se

destaca la capacidad de producir un patrón de glicosilación semejante al de las proteínas producidas de forma natural en el organismo humano, el cual no es obtenido adecuada o eficientemente en sistemas basados en bacterias, hongos o plantas (Fauser y cols.,2009).

Un ejemplo de proteínas recombinantes complejas cuya actividad biológica depende de un adecuado patrón de N-glicosilación, es la **eritropoyetina humana (hEPO)** (Andersen y cols, 2014 ; Fisher y cols., 1972; Wang y cols., 1985). Esta hormona glicoproteíca tiene un peso molecular de aproximadamente 45kDa en su forma nativa, y entre un 30-40% de dicho peso corresponde a O y N-glicosilaciones, (Jiang y cols, 2014).

La eritropoyetina humana (hEPO) es una hormona glicoproteíca que estimula la eritropoyesis mediante la unión a su receptor EPO-R que se encuentra en las células progenitoras eritroides (Andersen y cols, 2014; Fisher y cols., 1972; Wang y cols., 1985). En adultos humanos sanos, la hEPO es sintetizada a nivel renal, y actúa sobre la médula ósea para aumentar la producción de células eritroides en la sangre (Koeffler y cols, 1981). Pacientes que presentan insuficiencia renal crónica y no son capaces de sintetizar hEPO, cursan cuadros de anemia y requieren tratamientos de administración con hEPO exógena. Además, esta hormona presenta una alta demanda como complemento a terapias asociadas a otras enfermedades como SIDA y cáncer (Hiradfar y cols, 2014; Adamson y cols., 1990). En la actualidad, la hEPO humana recombinante es expresada en cultivos artificiales de células de mamíferos (Jiang y cols, 2014).

La hEPO recombinante presente en el mercado se expresa mayoritariamente en células de ovario de hámster chino (CHO). De igual forma, otras líneas celulares, tales como las derivadas de mieloma de ratón (NS0), de riñón de hámster (BHK),



riñón de embrión humano (HEK-293) y las células de la retina humana también han ganado la aprobación regulatoria para este fin (Zhu y cols, 2008; Paddler y cols, 2011). Sin embargo, el empleo de medios de cultivos requeridos para la mantención de células de mamífero, se traduce en procesos de producción costosos y técnicamente exigentes (Engrie y cols.,2013; Chu y cols., 2001).

Con el objetivo de desarrollar un proceso de producción de bajo costo, se ha explorado la posibilidad de expresar EPO humana recombinante en la leche de mamíferos transgénicos (Houdebine, 2000; Wheeler, 2003). No obstante, la expresión ectópica de los transgenes es una enorme limitación del sistema, pues en algunos casos puede afectar drásticamente la viabilidad del animal transformado, como es el caso de hEPO (Massoud y col., 1996). Además, para la generación de animales de granja transgénicos es necesario disponer de un elevado número de hembras, tanto de donantes como de receptoras. Estas son indispensables para tener éxito en la transformación genética e implantación de los embriones que darían lugar a las crías transgénicas. Asociados a estos gastos se pueden añadir los altos costos de los insumos y equipamientos que se requieren para desarrollar las técnicas de transferencia de ADN recombinante a embriones de mamíferos y el posterior cultivo *in vitro* (Rudolph, 1999; Niemann y Kues, 2003).

En consecuencia, una solución alternativa para evadir las deficiencias actuales asociadas a la transgénesis, es la transferencia directa del material genético exógeno a células del epitelio glandular mamario de dichos animales mediante el uso de vectores virales (Schagen y cols., 2004).

Los vectores adenovirales se utilizan de forma exitosa en múltiples ensayos de terapia génica, dada su elevada capacidad de transducir células tanto quiescentes como en división (Nadeau y Kamen, 2003; Schagen y cols., 2004). Se han optimizado los

sistemas de multiplicación de estos vectores para obtener elevados títulos, facilitando de esta forma su manipulación (Kamen y Henry, 2004). Por tal motivo, los vectores adenovirales resultan ser una alternativa apropiada para la transformación *in situ* de la glándula mamaria (Nadeau y cols., 2003). Dichos vectores virales presentan un genoma de DNA bicatenario, y poseen una actividad episomal tal que su ADN se transcribe de forma independiente al de la célula huésped, de tal forma que la expresión de los genes de interés no se vea afectada por eventos dependientes del sitio de integración (Houdebine y cols., 2000).

Así, la transducción directa de células de mamífero secretoras con vectores de adenovirus han demostrado la posibilidad de producir altos niveles de la hormona de crecimiento humana en la leche de ratones y cabras (Sánchez y cols., 2004). De esta forma, la transducción del epitelio glandular mamario con vectores adenovirales codificantes para el cDNA de hEPO ha resultado en la expresión de la glicoproteína recombinante a niveles de hasta 2 g / L (Liu y cols., 2010; Toledo y cols., 2006). Este resultado demuestra la capacidad de producir altos niveles de proteínas recombinantes en la leche. Sin embargo, la hEPO recombinante derivada de la leche muestra una actividad hematopoyética *in vivo* disminuida debido a su bajo nivel de sialilación (Montesino y cols., 2010).

Se han realizado múltiples modificaciones en la estructura nativa de la hEPO para mejorar sus propiedades hematopoyéticas y la biodisponibilidad de la glicohormona (Elliot 2003 y 2004). Para ello, se han empleado enfoques como glicoingeniería con el fin de modificar las propiedades farmacocinéticas de la hEPO a partir de cambios en las estructuras glicosídicas N-enlazadas a la molécula. Actualmente se encuentra disponible una variante hiperglicosilado de hEPO, darbepoetin alfa (DA), que contiene dos sitios adicionales de N-glicosilación unidos a la secuencia primaria de hEPO. Esta modificación se tradujo en un aumento de tres veces en la vida media en suero y

en actividad hematopoyética vivo, en comparación con la EPO no modificada recombinante (Egrie y cols., 2003).

Por otro lado, diversos estudios han demostrado la correlación entre el tamaño molecular de eritropoyetina expresada en diferentes cultivos celulares y la tasa de aclaramiento por filtración glomerular, así como por otros mecanismos (Komada y cols., 1994; Ashkenazi y cols, 1994). Un claro ejemplo, es una variante de hEPO conjugada con polietilenglicol (hEPO pegilada) posee un peso molecular superior y por lo tanto un incremento significativo en su vida media plasmática (Wang y cols., 2010). Estas observaciones sugieren que el aumento del tamaño molecular de la EPO humana nativa podría conducir a un incremento en la vida media en suero. Por tanto a modo de resumen, 1) los factores principales que regulan la biodisponibilidad *in vivo* de hEPO en el plasma sanguíneo, son las estructuras glicosídicas y el tamaño molecular de la hormona, mediante mecanismo de depuración hepática y renal respectivamente. 2) Que la hEPO recombinante expresada en la glándula mamaria presenta una actividad hematopoyética disminuida producto patrón de glicosilación específico de la glándula mamaria. 3) Que la generación de una variante de hEPO de peso molecular aumentada genera un incremento en su biodisponibilidad.

## **II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **II.1. Expresión de proteínas recombinantes**

El desarrollo en la tecnología del ADN recombinante, a mediados de la década de los 70 del pasado siglo, marcó el comienzo de la era moderna en la biotecnología. La industria biofarmacéutica con la generación de proteínas con fines terapéuticos representa la mayor aplicación industrial de esta tecnología (Walsh, 2003). En este sentido, la producción de proteínas recombinantes y el desarrollo de modelos animales forman parte de los objetivos fundamentales de varios grupos de

investigación. Gran cantidad de organismos son utilizados como biorreactores para la producción de proteínas heterólogas, entre los que se destacan las bacterias y las levaduras como los más simples y baratos, mientras los cultivos artificiales de tejidos y los organismos genéticamente modificados son considerados como los más complejos y costosos (Molowa y Mazanet, 2003). La selección de un organismo u otro para la expresión de proteínas de interés biofarmacéutico está relacionada con los eventos post-traduccionales específicos, necesarios para que ocurran los plegamientos correctos que garanticen la actividad biológica de la molécula. Este es un elemento que define los posibles hospedantes a escoger.

### **II.1.1. Expresión de proteínas recombinantes en procariontes**

La especie más empleada para la producción de altos niveles de proteínas recombinantes en procariontes es *Escherichia coli*, que ha sido ampliamente estudiada genética y fisiológicamente (Marino, 1989; Hodgson, 1993; Thomas y col., 1997). Entre las ventajas que brinda este microorganismo como biorreactor se encuentran: *i*) rápida generación de biomasa dada su elevada velocidad de crecimiento, *ii*) fácil manipulación genética, *iii*) no requiere de medios de cultivo ni equipamientos costosos, *iv*) alta eficiencia en la incorporación del material genético foráneo (Drury, 1994; Georgiou y Valax, 1996). Sin embargo, la expresión de proteínas en procariontes tiene la desventaja de que estos microorganismos no poseen la capacidad de producir muchas de las modificaciones post-traduccionales necesarias para obtener las proteínas recombinantes biológicamente activas. En estos hospedantes no ocurre la formación de puentes bisulfuro entre las cisteínas, debido a que el ambiente intracelular es muy reductor. Además, no son capaces de enlazar oligosacáridos a las proteínas durante su síntesis, ni de modificar las tirosinas mediante sulfatación (Palomares y col., 2004). En bacterias es poco probable la secreción de proteínas recombinantes al medio extracelular y frecuentemente las

proteínas al ser expresadas se acumulan como agregados insolubles en el citoplasma, denominados cuerpos de inclusión. Para la purificación de proteínas a partir de estos cuerpos de inclusión es necesario el uso de agentes caotrópicos que tienden a desnaturalizar la proteína recombinante. Estas sustancias pudieran alterar la estructura terciaria de las proteínas, lo que conduciría a la disminución o eliminación de la actividad biológica inherente a estas moléculas (Wilkinson y Harrison, 1991; Mayer y Buchner, 2004).

### **II.1.2. Expresión de proteínas recombinantes en eucariontes inferiores.**

Las levaduras muestran importantes ventajas sobre las bacterias como hospedantes para la producción de proteínas heterólogas de origen eucariótico (Romano, 1995). Estas combinan la simplicidad de los sistemas de expresión bacterianos con los bajos costos de los medios de cultivo, además poseen un medio intracelular más apropiado para el procesamiento post-traducciona l y la secreción (Sudbery, 1996). Adicionalmente, las levaduras glicosilan las proteínas, lo que influye positivamente en la integridad estructural, solubilidad y actividad biológica de las cadenas polipeptídicas sintetizadas (Narhi y col., 1991; Kobata, 1992; Varki, 1993). Sin embargo, los sistemas de expresión basados en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* presentaron problemas al tratar de llevar a escala industrial los procesos establecidos al nivel de laboratorio, en su mayoría, relacionados con la inestabilidad de las multicopias del plasmidio transformante en un ambiente de alta densidad celular (Srienc y col., 1986). Por otra parte, la incorporación de cadenas de oligosacáridos que contienen más de 50 residuos de manosa (Man) genera un perfil muy diferente al de la proteína nativa. Además, las manosas terminales unidas al resto de la cadena mediante un enlace del tipo  $\alpha$ 1-3, confieren a la proteína una elevada antigenicidad. La hipermanosilación también puede modificar la farmacocinética de las glicoproteínas, lo que limita la utilización de la molécula con fines terapéuticos (Sudbery, 1996). Otro hospedante

muy utilizado en la actualidad, como sistema de expresión, es la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*. Esta levadura se caracteriza por una eficiente utilización del metanol como fuente de carbono y energía, aunque puede igualmente crecer en una gran variedad de sustratos (Wegner y Harder, 1986). Desde el punto de vista de la glicosilación, y a diferencia de *S. cerevisiae*, en la levadura *P. pastoris* se sintetizan cadenas de oligosacáridos de menor grado de polimerización que carecen cadenas de manosas terminales unidas por enlaces  $\alpha 1,3$ . Sin embargo el hecho de que solo se enlacen oligosacáridos del tipo oligomanosídico reduce la capacidad de este hospedante para la expresión de proteínas cuya actividad biológica esté directamente ligada a un patrón de glicosilación específico (Trimble y col., 1991).

Recientemente se logró modificar genéticamente la ruta enzimática de glicosilación de la *P. pastoris*, obteniéndose cepas capaces de generar patrones de glicosilación de tipo complejo. Esta es una novedosa alternativa para la producción de proteínas recombinantes en eucariontes inferiores que permite la obtención de la proteína de interés con un patrón de glicosilación específico y con una elevada homogeneidad en el mismo (Gerngross, 2004).

### **II.1.3. Plantas como biorreactores para la expresión de proteínas recombinantes**

Las plantas genéticamente transformadas representan una opción sumamente económica a los actuales sistemas de producción de biofármacos, debido a su bajo costo y capacidad de producción a gran escala; así como a la simplicidad de la cosecha y el almacenaje. La expresión de vacunas y anticuerpos en plantas despierta un interés especial en la actualidad como sistema de producción de proteínas farmacéuticas (Sharp y Doran, 2001; Mason y col., 2002; Schillberg y col., 2003). Las plantas son consideradas uno de los sistemas de producción más seguros ya que

carecen de secuencias de ADN oncógenas (Herbers y Sonnewald, 1999; Obermeyer y col., 2004).

Las plantas poseen ventajas sobre otros sistemas de producción, particularmente en términos del sentido práctico, de la economía y de la seguridad, pero al igual que las levaduras tienen la limitación de no generar perfiles de oligosacáridos de tipo complejo. En las plantas se encuentran ausentes tanto el precursor de ácido siálico como las enzimas encargadas de la elongación de las cadenas oligosacáridicas: la  $\beta$ 1,4-galactosiltransferasa y la sialiltransferasa (Blixt y col., 2002). Además, se conoce que la adición de xilosa  $\beta$ 1,2 y fructosa  $\alpha$ 1,3 genera biomoléculas con elevada antigenicidad en ratones y humanos (Bardor y col., 2003).

#### **II.1.4. Expresión de proteínas en cultivos celulares de mamíferos**

La mayoría de las proteínas utilizadas con fines terapéuticos en humanos, incluyendo las proteínas de la sangre como citoquinas e inmunoglobulinas, proteínas estructurales, hormonas y proteínas lisosomales, se dirigen hacia el lumen del retículo endoplasmático durante la traducción y posteriormente se transportan a través del aparato de Golgi a los compartimentos lisosomales, la matriz extracelular o al torrente sanguíneo (Werner y col., 1998). La mayor parte de las modificaciones de las proteínas durante su síntesis ocurre en estos compartimientos y comprenden los procesos de corte del péptido señal, formación de puentes disulfuro entre cisteínas, sulfatación de tirosinas, carboxilación, metilación, hidroxilación, fosforilación, N y O-glicosilación (Kaufman, 1998).

Existen varias proteínas humanas de gran interés farmacéutico, como la eritropoyetina (hEPO), la  $\alpha$ 1-antitripsina, el activador tisular del plasminógeno (tPA), los factores de la cascada de coagulación VIII y IX, la proteína C y el fibrinógeno; cuya



bioactividad, farmacocinética, estabilidad y solubilidad están estrechamente ligados a numerosos procesos de modificación post-traducciona l como los mencionados anteriormente. Debido a las características de estos biofármacos se hace necesaria su expresión en células hospedantes cuya maquinaria metabólica sea muy similar a la célula productora nativa (Chu y Robinson, 2001; Andersen y Krummen, 2002).

En la actualidad más del 60% de todas las proteínas recombinantes de interés farmacéutico se producen en cultivos celulares (Hesse y Wagner, 2000). A partir de que se estableció la primera línea celular en la década del 60 del pasado siglo (Hayflick y Moorhead, 1961), numerosos tipos celulares de diferentes tejidos y variadas especies se cultivan *in vitro*. Sin embargo, solo un número reducido de estas líneas se han modificado genéticamente como biorreactores debido a las restricciones de bioseguridad asociadas a la producción de Biofármacos (Facklam y Geyer, 1991). Las células más utilizadas en estos momentos son las líneas de células de ovario de hámster chino (CHO), las células derivadas de mieloma murino (NSO), las células de riñón de bebé de hámster (BHK), las células de riñón de embrión humano (HEK-293) y las células derivadas de retina humana (PERC6), (Wurm y Bernard, 1999). Además del adecuado procesamiento post-traducciona l, la secreción al medio es una de las mayores ventajas de la producción de biofármacos en cultivos celulares. La mayoría de los productos proteicos desarrollados por esta vía son modificados por ingeniería genética para promover su transporte al medio extracelular. Esto facilita en gran medida los procesos de purificación pues, por lo general el medio de cultivo es pobre en proteínas contaminantes (Berthold y Walter, 1994). El crecimiento acelerado de la industria farmacéutica propicia la generación de métodos cada vez más eficientes y específicos para optimizar la producción a partir de cultivos celulares (Hu y Aunins, 1997; Spier y Kadouri, 1997; Meissner y col., 2001). A pesar de todos los factores que favorecen a los cultivos celulares como sistemas ideales de expresión de proteínas complejas, los requerimientos biológicos de la técnica, así como la compleja



infraestructura que se necesita para realizarlos encarecen el producto final (Molowa y Mazanet, 2003). Una solución de costo-factibilidad podría estar en la utilización de los animales genéticamente modificados, que pueden llegar a convertirse en pequeñas biofábricas o biorreactores de proteínas recombinantes.

## **II.2. Animales como biorreactores**

Varias especies de animales se han modificado genéticamente para expresar proteínas recombinantes en sus fluidos corporales (Wall, 1996). Se define como transgénico a un organismo al cual se le inserta en su genoma un segmento de ADN exógeno y dicha modificación se trasmite a su descendencia. La transferencia del material genético para la generación de animales transgénicos se realiza en etapas iniciales del desarrollo embrionario, lo que favorece el paso de la nueva información a la línea germinal del individuo. Las aplicaciones principales de los animales transgénicos se concentran en la obtención de modelos animales y la producción de proteínas recombinantes (Thomson y col., 2003). Por lo general las proteínas recombinantes producidas en el animal transgénico se expresan en las células de un tejido específico y se secretan a un fluido corporal determinado. La eficiencia del sistema se refleja en la capacidad secretora del tejido escogido y en la facilidad para colectar el fluido al que se vierte la proteína heteróloga (Keefer, 2004). En mamíferos se han expresado proteínas recombinantes de interés biofarmacéutico en varios fluidos corporales. Ejemplos de lo anterior lo constituyen la secreción de anticuerpos humanos recombinantes al fluido sanguíneo de diferentes líneas transgénicas de ratones, conejos, cerdos y ovejas (Lo y col., 1991; Weidle y col., 1991), así como la expresión en la sangre de conejos transgénicos de  $\alpha$ 1-antitripsina humana biológicamente activa (Massoud y col., 1991). Una primera limitación de la expresión en sangre fue separar la proteína recombinante de su homóloga en el hospedante,

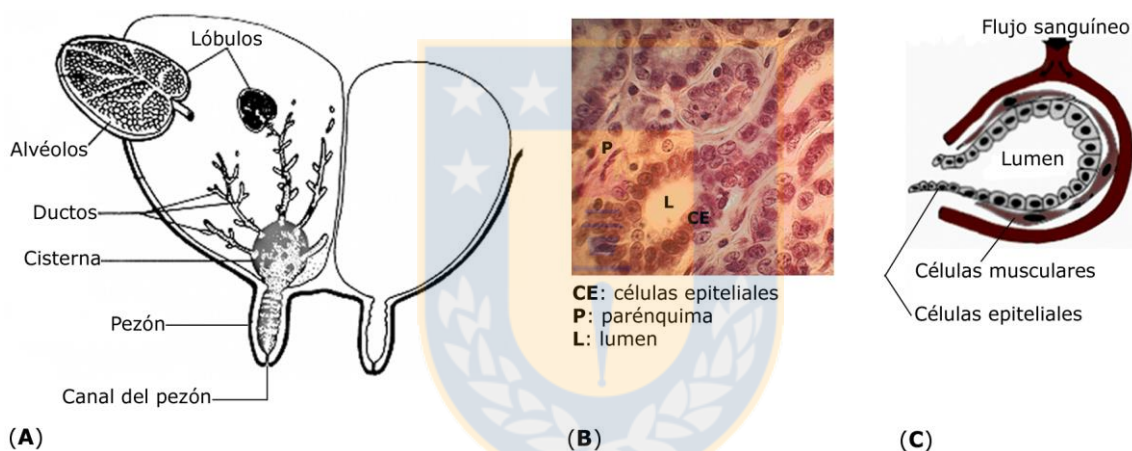
pues las características físico-bioquímicas de estas moléculas se mantienen muy conservadas entre los vertebrados. Además las proteínas secretadas al suero sanguíneo resultan poco estables en este medio o afectan drásticamente la sobrevivencia del organismo hospedante, lo que ha determinado que en la actualidad se considere este sistema como poco idóneo para la expresión de proteínas recombinantes con interés biofarmacéutico (Houdebine, 2000). En trabajos recientes se obtuvieron resultados interesantes basados en la expresión de biofármacos en orina (Keer y col., 1998) y en plasma seminal (Dyck y col., 1999). Sin embargo la glándula mamaria, con su elevada capacidad secretora y su facilidad para la extracción de la leche, es el órgano que ha resultado más factible para la producción de proteínas recombinantes (Colman, 1998).

## **II.2.1. Expresión de proteínas recombinantes en la glándula mamaria**

### **II.2.1.1. La glándula mamaria**

La glándula mamaria está compuesta por un parénquima que sostiene un árbol de ductos embebidos en una matriz de grasa. Estos ductos ascienden desde el canal del pezón y se bifurcan en canales más finos hasta terminar en una estructura circular denominada alvéolo (Fig. 1 A). El alvéolo, se encuentra recubierto por una capa de células epiteliales rodeadas por una capa de células musculares sensibles al estímulo de la oxitocina (Fig. 1 B, C). En presencia de esta hormona, las células musculares se contraen y la leche presente en el lumen del alveolo sale al exterior (Allen, 1990). Los terminales ductales desembocan en unos reservorios denominados galactóforos, dilataciones situadas inmediatamente detrás del pezón donde confluye la leche. En los rumiantes, los galactóforos están conectados y se ensanchan hasta formar una cisterna donde se acumula la leche en grandes volúmenes; un grupo de ligamentos y

tejido conectivo mantiene la glándula fija al cuerpo y todo el conjunto se recubre por una capa de piel que conforma la ubre (Fig. 1 A), (Fleet y col., 1975). Las células epiteliales mamarias que recubren el alvéolo integran la unidad de síntesis y secreción. Durante el período de lactancia, estas células epiteliales reciben señales hormonales que activan los promotores de genes que codifican proteínas específicas que son producidas y secretadas al fluido lácteo. Además, a través del epitelio mamario, ocurre el transporte de biomoléculas desde la sangre hasta la leche (Linzell y Peaker, 1971).



**Fig.1.** Características morfológicas de la glándula mamaria. **A:** Representación esquemática de la glándula mamaria de rumiantes. **B:** Corte histológico de tejido glandular mamario de una hembra lactante, se observa el conjunto de células epiteliales que conforman la estructura alveolar. **C:** Esquema representativo del alvéolo mamario. (Tomado de: [www.agrobit.com/images/udder2.gif](http://www.agrobit.com/images/udder2.gif)).

La leche es un fluido muy abundante en algunos mamíferos y rico en proteínas, sobre todo en rumiantes, donde se llegan a producir 200 g de proteína por día en cabra y hasta 1 kg en vacunos (Rudolph, 1999). Varios estudios han probado que la glándula mamaria tiene capacidad para producir una variedad de proteínas recombinantes

biológicamente activas, entre ellas podemos mencionar el tPA (Gordon y col., 1992), la hormona de crecimiento humana (hGH), (Devinoy y col., 1994), el factor de crecimiento neuronal (Coulibaly y col., 1999), la proteína C humana (Van Cotty col., 2001), la antitrombina humana (ATh), (Edmunds y col., 1998) y la lactoferrina humana (Van Berkel y col., 2002), (ver Tabla 1).

### **II.2.1.2. Transgénesis aplicada a la glándula mamaria**

En 1987, Lothar Hennighausen y Heiner Westpal del “National Institute of Health” de EE.UU, en colaboración con Katy Gordon de “Integrated Genetics Institutes”, marcaron un hito en el campo de la biotecnología cuando expresaron el activador tisular del plasminógeno humano en la glándula mamaria de ratones transgénicos (Gordon y col., 1992). Desde entonces se han realizado múltiples estudios que contribuyen al desarrollo de técnicas más eficiente para la generación de mamíferos transgénicos productores de proteínas recombinantes en la leche.

La expresión de elevados niveles de estas proteínas en la glándula mamaria depende, en gran medida, del casete de expresión utilizado y del método para la transferencia del material genético. En este sentido, la fortaleza del promotor es muy importante. Los promotores más utilizados son precisamente aquellos que regulan normalmente la expresión de las proteínas propias de la leche, lo que permite dirigir la expresión de la proteína recombinante de forma específica a las células epiteliales mamarias. La fortaleza de los promotores propios de las proteínas de la leche varía entre las diferentes proteínas e incluso entre las diferentes especies. Se han descrito como promotores débiles los promotores de la kappa-caseína y la  $\alpha$ S2-caseína (Houdebine, 2000), mientras que el promotor de la proteína ácida del suero de rata

(WAPr) (Krnacik y col., 1995), el de la  $\alpha$ S1-caseína de cabra (Meade, 1999) y el de la  $\beta$ -lactoglobulina de oveja (Writhg y col., 1991) han resultado muy fuertes (Tabla 1).

Se comprobó además que para un mismo casete de expresión, los niveles de producción de la proteína recombinante varían de una línea transgénica a otra. Esta variación se atribuye a un fenómeno denominado “efecto de posición”, donde el silenciamiento en la expresión del transgén está determinado por la región de la cromatina, heterocromatina o eucromatina, en la cual este se inserta (Clark y col., 1994; Krnacik y col., 1995). En la actualidad se han diseñado casetes para la expresión de proteínas recombinantes en la glándula mamaria que comprenden la combinación de grandes secuencias reguladoras de los promotores y elementos reguladores lejanos, como los LCRs (locus control regions) (Dillon y Grosveld, 1993), los “insulator” (Chungy col., 1993) y los MARs (matrix attachment regions) (Forrestery col., 1994). Estos elementos reguladores pueden formar dominios de transcripción activa independientes del sitio de integración.

La especificidad de los promotores es otro punto importante en la transgénesis, dada la alta homología que presentan algunos transgenes con las proteínas endógenas del hospedante. Cuando el transgén se expresa en tejidos ectópicos en las diferentes etapas de desarrollo del hospedante, puede afectar seriamente su fisiología (Massoud y col., 1996). A este fenómeno se le denomina efecto colateral de la expresión ectópica del transgén. Algunas proteínas recombinantes, como la eritropoyetina, causan severos daños en el hospedante cuando son expresadas bajo el control de promotores que no son regulados estrictamente (Massoud y col., 1996; Schanbacher y Amstutz, 1997).

**Tabla 1.** Proteínas humanas de interés biofarmacéutico expresadas en la leche de mamíferos transgénicos (Rudolph, 1999). ADNc: ADN complementario; hEPO: eritropoyetina humana; hGH: hormona de crecimiento humana; tPA: activador tisular del plasminógeno; WAP: proteína ácida del suero.

Proteína	Transgén	Promotor	Expresión	Referencia
<b>VACA</b>				
Lactoferrina	ADN genómico	$\alpha$ -S1caseína bovina	2 mg/mL	van Berkel y col., 2002
<b>CABRA</b>				
Antitrombina III	ADNc	$\beta$ -caseína de cabra	14 mg/mL	Edmunds y col., 1998
$\alpha$ S1-antitripsina	ADN genómico	$\beta$ -caseína de cabra	20 mg/mL	Meade, 1999
tPA	ADNc	$\beta$ -caseína de cabra	6 mg/mL	Ebert y col., 1994
<b>CERDO</b>				
Factor VIII	ADNc	WAP murino	2.7 $\mu$ g/mL	Paleyanda y col.1997
Proteína C.	ADNc	WAP murino	1 $\mu$ g/mL	Van Cott y col., 2001
Factor IX	ADNc	WAP murino	0.2 mg/mL	Van Cott y col., 1999
<b>CONEJO</b>				
Superóx. Dismutasa	ADNc	WAP murino	2.9 mg/mL	Stromqvist y col., 1997
EPOh	ADNc	WAP de conejo	50 $\mu$ g/mL	Massoud y col., 1996
EPOh	Prot. de fusión	$\beta$ -lactoglob. bovina	50 $\mu$ g/mL	Korhonen y col.,1997
hGH	ADN genómico	WAP murino	50 $\mu$ g/mL	Devinoy y col., 1994
Interleucina-2	ADN genómico	$\beta$ -caseína de conejo	0.5 $\mu$ g/mL	Buhle y col., 1990
Factor de crecimiento insulínico 1	ADNc	$\beta$ -caseína de conejo	1 mg/mL	Brem y col., 1994
<b>OVEJA</b>				
$\alpha$ 1-antitripsina	Minigén	$\alpha$ -S1caseína bovina	35 mg/mL	Wright y col., 1991
Factor VIII	ADNc	$\beta$ -lactoglob. ovina	6 ng/mL	Niemann y col., 1999
Factor IX	ADNc	$\beta$ -lactoglob. ovina	5 $\mu$ g/mL	Clark y col., 1989
Fibrinógeno	ADN genómico	$\beta$ -lactoglob. ovina	5 mg/mL	Buttler y col., 1997

### II. 2.1.3. Transferencia génica

Los primeros métodos utilizados para la transferencia de ADN heterólogo a embriones de mamíferos se basaron en vectores retrovirales. Jaenisch en 1974, describió la infección de blastocistos de ratón con el virus SV40 y la persistencia del genoma viral integrado en los animales adultos y en 1976, el propio Jaenisch obtuvo la transmisión mendeliana del virus de la leucemia murina (MMLV) en embriones de ratón

microinyectados con este retrovirus. Sin embargo, los oncoretrovirus tienen una capacidad de transducción limitada a células en división (Wolf y col., 2000). Debido a esto, la infección de embriones en una etapa temprana de desarrollo con vectores retrovirales resultó en una integración tardía y no homogénea a nivel de tejido, elementos que afectan considerablemente la eficiencia del método (Haskell y Bowen, 1995).

La reducida capacidad de clonaje, de menos de 10 kb, es otro inconveniente para el uso de los vectores retrovirales aplicados a la transgénesis. Esto dificulta el clonaje de las secuencias genómicas de las proteínas de interés, así como de las grandes regiones reguladoras propias de los promotores de las proteínas de la leche y de los elementos reguladores distales (Brem, 1993). Se refirió además, que las secuencias terminales repetidas que flanquean el genoma retroviral interfieren con los promotores de mamíferos y suprimen o disminuyen la expresión de los genes que regulan (Wells y col., 1999). De esta forma se desarrolla un fenómeno de silenciamiento de la expresión mediado por metilación en los transgenes y en las vecindades del sitio de integración (Jahner y Jaenisch, 1985; Chan y col., 1998).

Otro método utilizado para la transferencia de material genético foráneo es la microinyección de ADN en embriones unicelulares. Este método se ha utilizado, hasta la actualidad, como la técnica más universal de transferencia horizontal de material genético, desde el hallazgo de Gordon en 1980 (Baldassarre y col., 2003). Dicha técnica consiste en la microinyección del ADN foráneo en el pronúcleo de embriones unicelulares y la inserción al azar del material genético en el embrión microinyectado (Brem y col., 1985; Hammer y col., 1985). El método no ha variado sustancialmente en los últimos 25 años y se aplica en ratones, hámsteres, conejos, cerdos, ovejas, cabras y vacas (Houdebine, 2000). En la mayoría de los casos los embriones se extraen de una hembra donante, se microinyecta el ADN foráneo en uno de los



pronúcleos del cigoto y se transfiere a una hembra receptora que engendra las crías transformadas. En vacas, es necesario madurar los ovocitos y fertilizarlos *in vitro* para obtener un número suficiente de cigotos por hembra donante. Una vez nacidas las crías, denominadas fundadores, son analizadas para determinar la presencia del transgén insertado en el genoma y los individuos positivos se cruzan entre sí para obtener la línea genéticamente modificada.

Los inconvenientes principales de la microinyección aplicada a la generación de biorreactores, radican en la eficiencia de integración del transgén en rumiantes y otras especies mayores (menos del 2% en cerdos, ovejas y cabras; menos del 1% en vacas) y en el tiempo que transcurre para llegar a obtener un pequeño rebaño que produzca la proteína recombinante de interés (Tabla 2). Por estas razones se debe disponer de un número elevado de hembras donantes y receptoras para obtener un fundador inicial, lo cual encarece más el proceso (Wall, 1996; Wells y col., 1999).

La técnica de transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) se utilizó inicialmente para crear una copia genética idéntica, o clon, de un animal (Campbell y col., 1996) y representa en la actualidad un procedimiento alternativo para crear animales transgénicos. La TNCS a partir de células donantes genéticamente transformadas, permite la introducción directa de transgenes a ovocitos anucleados. Las células donantes son modificadas *in vitro* mediante la transfección de ADN exógeno, previo a que su material genético sea introducido y reprogramado en los embriones. Esto permite la selección de los transformantes por los métodos convencionales de biología molecular, en cuanto a sitio de integración, número de copias y niveles de expresión de la proteína recombinante. La técnica posibilita, además, la selección del sexo en la línea de fundadores, en dependencia del individuo escogido como donante de tejido (Cibelli y col., 1998).



**Tabla 2.** Cronología de la producción de proteínas recombinantes en la glándula mamaria de líneas transgénicas en diferentes especies de mamíferos (Rudolph, 1999).

	<b>CONEJO</b>	<b>CERDO</b>	<b>OVEJA</b>	<b>CABRA</b>	<b>VACA</b>
<b>Tiempo de gestación (meses)</b>	<b>1</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>9</b>
<b>Madurez sexual (meses)</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>15</b>
<b>Tiempo entre la introducción del transgén y el inicio de la lactación (meses)</b>					
<b><u>Fundador hembra</u></b>					
<b>Lactación inducida en la pubertad</b>	-	-	<b>9</b>	<b>9</b>	<b>16</b>
<b>Lactación natural</b>	<b>7</b>	<b>16</b>	<b>18</b>	<b>18</b>	<b>33</b>
<b><u>Fundador macho</u></b>					
<b>Lactación inducida en la pubertad (hijas)</b>	-	-	<b>22</b>	<b>22</b>	<b>45</b>
<b>Lactación natural (hijas)</b>	<b>15</b>	<b>28</b>	<b>31</b>	<b>31</b>	<b>57</b>
<b>Promedio de crías</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>1-2</b>	<b>1-2</b>	<b>1</b>
<b>Rendimiento anual de leche (L/año)</b>	<b>4-5<sup>a</sup></b>	<b>300<sup>b</sup></b>	<b>500</b>	<b>800</b>	<b>8000</b>
<b>Producción de materia prima de proteína recombinante / hembra / año (kg)</b>	<b>0.02</b>	<b>1.5</b>	<b>2.5</b>	<b>4</b>	<b>40</b>
<sup>a</sup> Promedio de producción de 3 lactaciones por año.					
<sup>b</sup> Promedio de producción de 2 lactaciones por año.					

De esta forma, el 100% de los fundadores serán transgénicos e idénticos, si provienen de una misma línea celular modificada. Hasta este punto, la TNCS constituía el método más eficiente para la obtención de mamíferos transgénicos como biorreactores. Sin embargo, persisten aún muchas limitaciones: la metodología es compleja, demanda equipamiento y reactivos muy caros y la eficiencia es muy baja en animales de granja; los nacimientos a partir de embriones clonados e implantados en hembras receptoras oscilan entre un 3-5%. En vacas, los fetos generados por TNCS, se pierden entre el día 35 y el 60 de gestación. La muerte fetal se incrementa en un

60% comparada con embriones generados a partir de la fertilización *in vitro*, (Hill y col., 1999).

Otra causa muy frecuente de pérdida de crías se debe a complicaciones en el embarazo, debido al síndrome del feto gigante. También se observan anomalías pulmonares y deficiencias metabólicas tanto en los fetos como en las crías recién nacidas, lo que aumenta el índice de mortalidad. Estos problemas se asocian a deficiencias en la reprogramación del genoma diploide, que se refleja en alteraciones letales en los diferentes estadios del desarrollo del embrión clonado (Stice y Rzucidlo, 2001).

En los últimos cinco años la transferencia de genes a embriones tempranos, mediada por vectores retrovirales, ha resurgido con el empleo de nuevos vectores lentivirales (Pfeifer y Verma, 2001). Los lentivirus son una familia de retrovirus que infectan células quiescentes y en división (Follenzi y col., 2000) con una elevada estabilidad y sin que se evidencie el indeseado efecto de silenciamiento génico (Pfeifer y col., 2002). En el 2003 Ikawa y col. obtuvieron un 60% de eficiencia de ratones transgénicos mediante la transducción de embriones con un vector lentiviral. Un grupo de investigadores de la *Ludwig-Maximilians University* de Munich, Alemania, liderados por el Dr. Alexander Pfeifer y el profesor Gottfried Brem obtuvieron 70% de eficiencia en la generación de cerdos transgénicos, mediante el sistema de transducción de embriones tempranos con vectores lentivirales (Hofmann y col., 2003). Un año más tarde, los mismos autores refieren un 100% de eficiencia en la generación de vacas transgénicas con este método (Hofmann y col., 2004). Estos resultados son los más alentadores obtenidos hasta el presente en el campo de la transgénesis aplicada a animales de granja.

#### **II.2.1.4. Modificación genética *in situ* del epitelio glandular mamario**

La generación de líneas transgénicas de animales de granja para la expresión de proteínas heterólogas es en la actualidad un proceso con muchas limitaciones. Como ya se debatió anteriormente, la eficiencia de integración del transgén es muy baja cuando se utiliza la técnica de microinyección. Además, el tiempo entre la microinyección del embrión y la obtención de la línea transgénica puede durar años en las especies más productivas (Tabla 2) y el costo en general es muy alto (Colman, 1999).

La modificación genética *in situ* de la glándula mamaria es una alternativa para evadir las limitaciones de la transgénesis. Este método consiste en transferir el ADN directamente a las células que constituyen el epitelio mamario de una hembra adulta. Una vez que ocurre la modificación genética, la proteína recombinante es secretada a la leche. La morfología de la glándula mamaria facilita el procedimiento; existe una comunicación directa, a través de los finos canales ductales, desde el alvéolo hasta el terminal del canal del pezón, lo que permite acceder desde el exterior hasta las células epiteliales mamarias sin necesidad de emplear la cirugía. Mediante la canalización del pezón es posible introducir un catéter al galactóforo o la cisterna e infundir antibióticos, fármacos o material genético a la glándula mamaria (Schanbacher y Amstutz, 1997).

El método de modificación genética *in situ* es aplicable a casi todas las especies de mamíferos independientemente de su fondo genético y permite la inserción de múltiples casetes de expresión. La regulación de éstos no se ve restringida a promotores tejido específicos y además, se reduce considerablemente el tiempo entre la aplicación del método de modificación y la obtención del producto de interés (Schanbacher y Amstutz, 1997). Se han utilizado múltiples estrategias para modificar

directamente la glándula mamaria, sin embargo no existe actualmente un método establecido que funcione de forma eficiente. Las principales limitaciones están asociadas a la baja eficiencia con que ocurre la modificación genética y al corto tiempo que se mantiene la expresión de la proteína heteróloga, lo que genera bajos niveles de producción.

En los últimos años se han desarrollado dos métodos fundamentales para la modificación genética *in situ* de la glándula mamaria: *i*) la transfección por métodos físico-químicos *ii*) la transducción basada en vectores virales. La transfección directa del epitelio mamario mediada por métodos físico-químicos se ensayó con varias metodologías. Entre ellas se encuentran la transfección *in situ* con complejos asociados a poliones como DEAE-dextrana y poli-L-lisina (Hens y col., 2000), la endocitosis mediada por receptor (Sobolev y col., 1998) y la transfección mediada por pistolas de genes (Furth y col., 1992; Kerry col., 1996). En algunos casos se detectó la presencia del transgén y la expresión de la proteína recombinante, aunque los niveles fueron tan bajos que ninguno de estos métodos se valoró positivamente como una posible vía de producción de proteínas en la glándula mamaria.

Los vectores retrovirales también se han manipulados para la introducción directa de genes en las células epiteliales mamarias. La capacidad de estos vectores de insertarse en el genoma hospedante se empleó para generar modelos animales útiles en estudios de cáncer de mama y terapia génica, mediante la técnica de infusión directa del virus a través del canal del pezón (Golovkina y col., 1996; Ozturk-Winder y col., 2002; Bao y col., 2004). En 1994 Archer y col. generaron un vector retroviral incompetente para la replicación, basado en un híbrido del MMLV y el virus de la leucemia del Gibón, que contenía insertado el gen de la hGH. Este vector fue infundido en la glándula mamaria de cabras con lactación inducida y la transducción retroviral en las células epiteliales mamarias condujo a la expresión del transgén. La

proteína recombinante se obtuvo en la leche de los animales tratados a razón de 60 ng/mL en el primer día de ordeño y disminuyó durante los próximos días hasta obtenerse una meseta de expresión de 12 ng/mL entre los días del 9 al 15 de lactación. Con este trabajo se comprobó la capacidad de transducción *in situ* de la glándula mamaria para la expresión de proteínas recombinantes, mediante la infusión directa de un vector retroviral. Sin embargo, los bajos niveles de expresión obtenidos desestiman este método como una posible aplicación práctica (Archer y col., 1994).

Los vectores adenovirales se emplean comúnmente en ensayos de terapia génica (Nadeau y Kamen, 2003; Schagen y col., 2004), y constituyen en la actualidad una herramienta importante para la transducción *in situ* de la glándula mamaria. Cuando el adenovirus infecta la célula diana no se integra al genoma celular, sino que permanece en el núcleo como una entidad independiente o epicromosomal. Por lo tanto, los casetes de expresión que portan la información genética no son sometidos al efecto de silenciamiento génico dependiente del sitio de integración. De esta forma se pueden introducir genes con copias múltiples e independientes en las células epiteliales mamarias mediante una infusión del vector viral a través del canal del pezón.

Los primeros ensayos realizados para la transducción directa de la glándula mamaria mediante vectores adenovirales se enfocaron en estudios de terapia génica aplicada a cáncer de mamas (Yang y col., 1995; Jeng y col., 1998). En trabajos más recientes, se infundió la glándula mamaria de cabras no lactantes con un vector adenoviral para secretar lisostatina, una proteína con actividad antibacteriana, como terapia contra la mastitis (Fan y col., 2002; Fan y col., 2004). La expresión de la proteína recombinante se detectó a partir de las secreciones de la ubre durante los 15 días posteriores a la infusión. Los niveles de expresión estuvieron en el orden de décimas de microgramos por mililitro en las secreciones mamarias, lo que resultó superior a lo referido para

retrovirus (Archer y col., 1994). Sin embargo no se cumplieron las expectativas de la aplicabilidad de estos resultados a un sistema productivo.

Russell y col. en el 2003 refieren la transducción de las células epiteliales mamarias murinas hasta 7 días después de una infusión de la glándula con un vector adenoviral que expresaba el gen reportero de la proteína verde fluorescente (GFP). En este caso no se detectaron alteraciones en el funcionamiento de las células transducidas, ni respuesta inflamatoria severa durante ese tiempo; pero se observó una mastitis severa en los animales tratados, a los 12 días después de la infusión con el vector adenoviral.

Aunque estos trabajos reflejan la capacidad de transducción de los vectores adenovirales en la glándula mamaria, los resultados no prueban su factibilidad como método de producción de proteínas recombinantes. Los principales inconvenientes radican en los bajos niveles y el corto tiempo de expresión de los transgenes.

### **II. 3. Glicosilación**

La célula eucariota presenta diferentes compartimentos de membrana con funciones específicas. El sistema de endomembranas que conforma la vía secretora es uno de los más especializados y está constituido por el retículo endoplasmático (RE), el pre-Golgi, el aparato de Golgi, membranas transportadoras y vesículas (De Duve, 1991). En la vía secretora se controla el ensamblaje de las proteínas recién sintetizadas y se define su destino en la célula. Uno de los eventos más importantes en estos compartimentos es la adición de oligosacáridos a las cadenas polipeptídicas nacientes. Este es un proceso dinámico que se inicia en el RE y fluye por los diferentes compartimentos del aparato de Golgi hasta la membrana plasmática (Roth, 2002).

La glicosilación se define como la unión de cadenas de azúcares a las moléculas de proteínas y en eucariontes está descrita como la mayor modificación covalente que define la estructura y la función de las proteínas secretables y de membranas (Hercovics y Orlean, 1993). A diferencia de la síntesis proteica, no existe un molde a partir del cual pueda ser copiada la posición de cada monosacárido en la cadena nascente. La estructura oligosacáridica es ensamblada en la medida en que el polipéptido migra por los diferentes compartimentos de membrana en la vía secretora. En estos, se encuentran ancladas enzimas específicas para cada segmento, que median cada una de las modificaciones de la cadena de oligosacáridos. La secuencia de dicha cadena va a depender mayoritariamente de las condiciones del microambiente celular, de la disponibilidad de donores y de la localización espacial de las enzimas en el sistema de endomembranas, específicamente el RE y el aparato de Golgi (Roth, 2002).

Existen dos tipos fundamentales de glicosilación, la O-glicosilación y la N-glicosilación. La O-glicosilación consiste en la modificación de la cadena polipeptídica a través de la unión sucesiva de moléculas de monosacáridos a la proteína, mediante un enlace covalente entre la N-acetil- $\alpha$ -D-galactosamina (GalNAc) y el grupo hidroxilo de la L-serina (Ser) o la L-treonina (Thr). Mientras que la adición de los N-glicanos está mediada por la unión covalente entre la N-acetil- $\beta$ -D-glucosamina (GlcNAc) y el nitrógeno del grupo amida de la L-asparagina (Asn). Las glicoproteínas pueden contener más de un sitio de glicosilación y pueden enlazar tanto N- como O-glicanos, unidos a la misma cadena polipeptídica. Un fenómeno muy común es el de la microheterogeneidad de las estructuras oligosacáridicas enlazadas a los residuos de aminoácidos, lo que genera una variabilidad de glicofomas para cada glicoproteína (Vincent e Imperiali, 2001).

El desarrollo de la biología celular y molecular reveló el importante papel que pueden desempeñar los azúcares en el reconocimiento célula-célula (Stamenkovic y col., 1992; Scholler y col., 2001), en el correcto plegamiento de la cadena polipeptídica naciente (O'Connor e Imperilai, 1996; Wujek y col., 2004) y en la actividad biológica de las glicoproteínas (Korner y col., 1999).

### II.3.1. N-glicosilación

La N-glicosilación comienza en el RE e incluye como primer paso la transferencia del oligosacárido pre-sintetizado al grupo amida de la asparagina, que se encuentra formando parte del tripéptido Asn-X-Thr (Ser), denominado en la literatura como “sequon”, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina (Nishikawa y Mizuno, 2001). La síntesis del precursor es un proceso asimétrico que se inicia en el lado citoplasmático de la membrana, donde se incorporan dos residuos de N-acetilglucosamina y cinco residuos de manosa ( $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ ) al dolicolpifosfato. Posteriormente, el precursor se traslada al lumen del RE por un movimiento transversal complejo, donde continúa la síntesis hasta la incorporación de nueve residuos de manosa y tres residuos de glucosa ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ), (Tai e Imperiali, 2001).

Una vez transferido el oligosacárido precursor al péptido naciente, la acción de exoglicosidasas específicas presentes en el lumen del RE lo transforma en un oligosacárido del tipo  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ , a la salida de éste. Cuando la glicoproteína inicia su tránsito por el aparato de Golgi, la estructura  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  puede ser modificada por manosidasas específicas residentes en este compartimento o extendida por la incorporación de otros monosacáridos. Estas modificaciones crean estructuras diferentes, que pueden ser del tipo: *i)* oligomanosídicas, *ii)* complejas e *iii)* híbridas



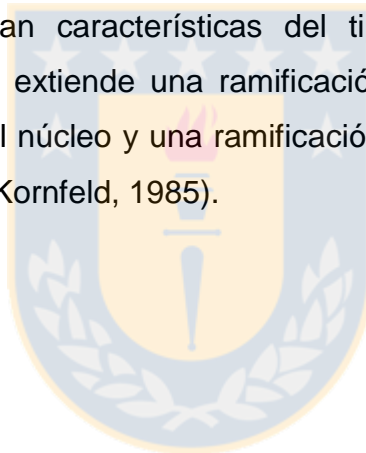
(Fig. 2). Independientemente del tipo de estructura sintetizada, el pentasacárido constituido por  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  (unido directamente a la Asn) se conserva durante las modificaciones que incorpora el oligosacárido inicialmente transferido al sitio de glicosilación, y es conocido como núcleo de las estructuras oligosacáridicas N-enlazadas (Kobata, 1992).

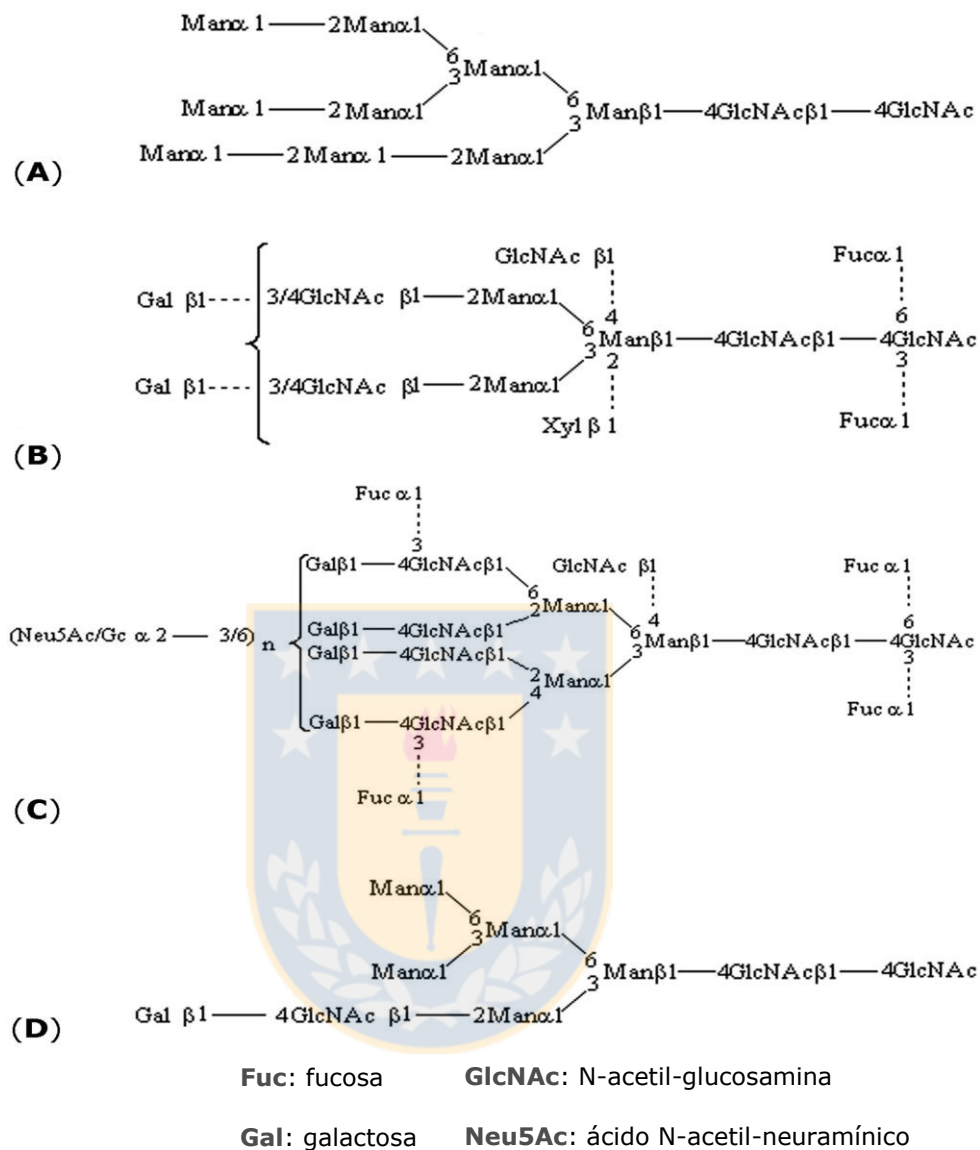
Las ramificaciones de N-glicanos de tipo oligomanosídico (Fig. 2 A) se caracterizan por poseer extensiones de manosas unidas  $\alpha 1-2$ ,  $\alpha 1-3$  y/o  $\alpha 1-6$  al núcleo  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ . Las dimensiones de dichas extensiones varían en dependencia de la proteína expresada y de la célula hospedante donde ésta se sintetiza. Así, estructuras de tipo  $\text{Man}_{6-9}\text{GlcNAc}_2$  se encuentran en eucariontes superiores, mientras que en *P. pastoris* son comunes estructuras del tipo  $\text{Man}_{9-15}\text{GlcNAc}_2$  y en *S. cerevisiae* pueden llegar hasta  $\text{Man}_{50-150}\text{GlcNAc}_2$  (Sudbery, 1996).

Las estructuras de oligosacáridos N-enlazados del tipo complejo (Fig. 2 B, C) están formadas por una gama de monosacáridos cuya distribución genera combinaciones heterogéneas. A partir de los residuos de manosas terminales  $\alpha$  enlazados ( $\text{Man}_\alpha$ ) del núcleo  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  se sintetizan extensiones o antenas mediante la adición de residuos de N-acetil-lactosamina ( $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ ). Como consecuencia, se forman estructuras complejas bi, tri o tetrantenarias, según el número de residuos que se añaden a los  $\text{Man}_\alpha$ . En las estructuras biantenarias (Fig. 2 B) son comunes las uniones  $\beta 1-2$  entre los residuos de N-acetil-lactosamina y las manosas terminales del núcleo. Las estructuras tri y tetrantenarias (Fig. 2 C) se obtienen por uniones adicionales del disacárido  $\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNAc}$  en posición  $\beta 1-4/6$ , a los mismos residuos de  $\text{Man}_\alpha$ . A partir de estas ramificaciones se puede encontrar ácido N-acetil-neuramínico y/o ácido N-glicolil-neuramínico terminales mediante enlaces  $\alpha 2-3/6$ . Además, es frecuente la adición de fucosa (Fuc) enlazada  $\alpha 1-3/6$  al residuo  $\text{GlcNAc}$

del extremo reductor y la adición de xilosa (Xy)  $\beta$ 1-2 o GlcNAc  $\beta$ 1-4 al residuo Man $\beta$  del núcleo (Dwek y Quicho, 1991).

Estas son las estructuras complejas más abundantes, aunque existe una gran heterogeneidad de isoformas posibles. Al igual que en las ramificaciones oligomanosídicas los oligosacáridos de tipo complejo varían en dependencia de las características de la proteína a que se unen y al sistema hospedante donde se expresan. Se puede observar también el fenómeno de microheterogeneidad por sitio. Una proteína expresada en un hospedante determinado no tiene homogeneidad en la estructura de la cadena de oligosacáridos para un mismo sitio de glicosilación; por lo que se generan isoformas de estructuras para dicho sitio. Los N-glicanos de tipo híbrido (Fig. 2 D) muestran características del tipo oligomanosídico y del tipo complejo. En este caso se extiende una ramificación de tipo complejo a partir del monosacárido Man $\alpha$  1-3 del núcleo y una ramificación del tipo oligomanósido a partir de la Man $\alpha$  1-6 (Kornfeld y Kornfeld, 1985).





**Fig. 2 Estructuras probables de oligosacáridos N-enlazados (Kornfeld y Kornfeld, 1985).**

**A:** Estructura de N-glicanos tipo oligomanósido.

**B:** Estructura de N-glicanos tipo complejo. Se observa la formación de diantenas terminales de galactosa. Las líneas discontinuas representan uniones alternativas.

**C:** Estructura de N-glicanos tipo complejo. Se observa la formación de tetrantenas que pueden terminar en ácido N-acetil-neuramínico o ácido N-glicolil-neuramínico. Las líneas discontinuas representan uniones alternativas.

**D:** Estructura de N-glicanos tipo híbrido.

## II.4. Adenovirus

Los adenovirus fueron aislados y caracterizados por primera vez en 1953 al estudiar el origen de las enfermedades del tracto respiratorio superior en humanos. El prefijo “adeno” proviene del tejido a partir del cual fueron aislados, el tejido glandular adenoide. Los estudios epidemiológicos demostraron que los adenovirus son causantes de enfermedades respiratorias febriles agudas y han sido asociados a la conjuntivitis epidérmica y a una gran variedad de gastroenteritis infantiles (Yolken y col., 1982). Actualmente ya han sido identificados unos 100 miembros del grupo adenoviral, cuyos hospedantes incluyen mamíferos y aves. Los serotipos más estudiados han sido el 2 (Ad2) y el 5 (Ad5), (Belousova y col., 2002; Musher, 2003).

### II.4.1. Clasificación

Los adenovirus constituyen la familia *Adenoviridae*, dividida en dos géneros: Mastadenovirus (virus humanos, de simios, bovino, equino, porcino, ovino y canino) y Aviadenovirus (limitada a virus de aves). Se han identificado 49 serotipos adenovirales humanos. Los serotipos se clasifican en 6 subgrupos, basados en la aglutinación de células sanguíneas y otras propiedades como la oncogenicidad del virus en roedores recién nacidos. El subgrupo A induce tumores con alta frecuencia, el B de forma moderada y los subgrupos C, D, E y F carecen de actividad oncogénica (Chiu y col., 2001).

### II.4.2. Estructura

Los adenovirus presentan una simetría icosaédrica, con 20 superficies triangulares y 12 vértices, en un diámetro total de 70 a 100 nm. Las partículas virales están

compuestas por un 13% de material genético (ADN) y un 87% de proteínas y trazas de carbohidratos. La cápsida se compone de 252 capsómeros, de los cuales 240 son hexámeros y 12 pentámeros (simetría 2-3-5). Cada pentámero contiene una base, que forma parte de la superficie de la cápsida y una fibra proyectada hacia el exterior, cuya longitud varía entre los diferentes serotipos (Lortat-Jacob y col., 2001), (Fig. 3).

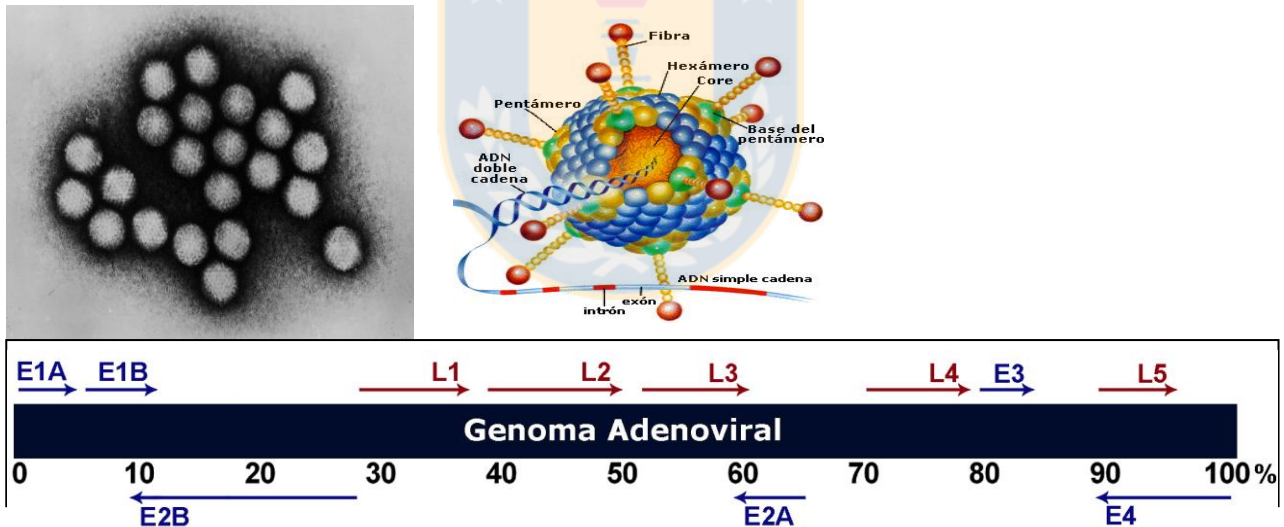
La proteína fibrilar que surge de cada vértice está compuesta por 3 copias del polipéptido IV. Sus residuos amino-terminales están unidos a la base del pentámero. El número de unidades repetidas difiere entre serotipos. El extremo carboxilo-terminal contribuye a la formación de un bulbo terminal que interactúa con el receptor en la célula diana. La proteína IV participa en el empaquetamiento del ADN viral. La cápsida está conformada por 7 proteínas, mientras que el núcleo contiene 4 proteínas y el genoma viral, el cual contacta con 3 de ellas, ricas en arginina (polipéptido V, VII y mu). El polipéptido V conecta el núcleo y la cápsida. La proteína VII es la mayor de las proteínas del núcleo y tiene una función semejante a las histonas, se asocia de forma no covalente al genoma y genera una sustancia semejante a la cromatina; mientras que la función del polipéptido mu es aún desconocida. La cuarta proteína es la llamada proteína terminal (TP) que se une covalentemente por un enlace fosfodiéster al extremo 5' del ADN. Esta proteína se considera iniciadora de la replicación del genoma viral y media la unión a la matriz nuclear (Tabla 3) (Zhang e Imperiali, 2003).

#### **II.4.3. Organización del genoma**

El genoma adenoviral es lineal, posee una talla de 30-38 kb que varía según el grupo y, teóricamente tiene la capacidad de codificar entre 30 y 40 genes. El ADN contiene secuencias repetidas e invertidas en sus extremos de una longitud de entre 100 y 140 pb denominadas ITR. Estas secuencias posibilitan el proceso de recircularización de la cadena de ADN, que es imprescindible para su replicación. Además, cuenta con

una secuencia empaquetadora, ubicada a unos cien pares de bases del final del cromosoma, que sirve de guía para la interacción del ADN viral con sus capsómeros. Ambas hebras de ADN son codificantes (Ikeda y col., 2003).

El cromosoma consta de cinco unidades de transcripción tempranas (E1A, E1B, E2, E3 y E4), dos unidades de transcripción tardía (L1 y L2) y una unidad muy tardía que es procesada para generar 5 familias de ARNm tardíos (de L3 a L5) (Fig. 3). Estos genes se transcriben por la enzima ARN polimerasa II. El cromosoma también contiene uno o dos genes VA (según el serotipo) transcritos por la enzima ARN polimerasa III. Por convención, el gen E1A se coloca en el extremo izquierdo del mapa genético; le siguen E1B, IX, mayor tardío, VA, E3, E4, E2 y IVa2. La activación de cada unidad transcripcional se determina por su propia localización en el cromosoma y por la localización relativa de las demás unidades. Los ARNm resultantes de la transcripción se diferencian mediante un proceso de "splicing" y por el uso de diferentes sitios poli-A (Kawakami y col., 2003).



**Fig. 3. Estructura del adenovirus humano serotipo 5**

1) Micrografía electrónica de transmisión de adenovirus humano de tipo C

2) Estructura del adenovirus humano serotipo 5 (Tomado de: <http://nobelprize.org/medicine>)

3) Mapa representativo del genoma del adenovirus humano serotipo 5 (Ferreira y col., 2005).

#### II.4.4. Ciclo replicativo de los adenovirus

La replicación de los adenovirus está dividida en dos fases: temprana y tardía. La fase temprana comienza una vez que el virus interacciona con la célula hospedante y consta de las siguientes etapas: adsorción, penetración y transcripción de genes tempranos. Durante la fase tardía se desarrolla la expresión de genes tardíos y el ensamblaje de los viriones.

**Tabla 3.** Proteínas adenovirales y su función (Zhang e Imperiali, 2003).

<b>Proteína</b>	<b>Localización</b>	<b>Funciones conocidas</b>
<b>Polipéptido II</b>	Monómero hexamérico	<b>Estructural</b>
<b>Polipéptido III</b>	Base del pentámero	<b>Penetración</b>
<b>Polipéptido IIIa</b>	Base del pentámero	<b>Penetración</b>
<b>Polipéptido IV</b>	Fibra	<b>Unión al receptor</b>
<b>Polipéptido V</b>	Núcleo	<b>Empaquetamiento</b>
<b>Polipéptido VI</b>	Hexámero	<b>Ensamblado de la partícula</b>
<b>Polipéptido VII</b>	Núcleo	<b>Semejante a histonas.</b>
<b>Polipéptido VIII</b>	Hexámero	<b>Ensamblado de la partícula</b>
<b>Polipéptido IX</b>	Hexámero	<b>Ensamblado de la partícula</b>
<b>TP</b>	Genoma	<b>Replicación del genoma</b>
TP: Proteína Terminal.		

La unión de la partícula viral a la superficie celular es mediada por la fibra proteica, a través de la región carboxilo-terminal, que se une al receptor celular. El receptor primario de los adenovirus es el receptor de coxsackievirus y adenovirus (CAR), proteína de 46 kDa, ubicada en la membrana celular y relacionada con la familia de las inmunoglobulinas (Tomko y col., 1997). La proteína está compuesta por un dominio extracelular, un dominio transmembrana típicamente hidrofóbico y un dominio citoplasmático (Bergelson y col., 1998). Se ha observado que el CAR media la interacción de células homotípicas, contribuye a la integridad de las uniones epiteliales estrechas y regula el crecimiento de las células tumorales, pero su función natural exacta no se ha definido aún (Petrella y col., 2002).

La adsorción adenovirus-célula hospedera es un proceso lento que necesita varias horas para ser máximo y donde también interactúan integrinas de membrana con la secuencia Arg-Gly-Asp presente en el polipéptido III del pentámero. La entrada a la célula tiene lugar mediante vacuolas fagocíticas y la ruptura de las mismas ocurre debido a la actividad tóxica del pentámero; lo que libera las partículas virales al citoplasma (Bergelson y col., 1997). El desnudamiento del virus ocurre de forma ordenada, primero son liberados los pentámeros y se obtiene una partícula esférica semidesnuda. Posteriormente el ADN migra hacia el núcleo, donde penetra a través de los poros nucleares y se convierte en una estructura fácilmente digerible por la ADNasa I para generar fragmentos que forman un patrón similar al de la cromatina. Las histonas celulares reemplazan al polipéptido VII, el mayor constituyente del núcleo, antes de que se transcriba el ADN viral (Kasamatsu y Nakanishi, 1998; Kirby y col., 2000).



#### **II.4.5. Activación de genes tempranos**

Los genes tempranos están directamente relacionados con la expresión de proteínas involucradas en la replicación del genoma viral. La activación de los genes tempranos es determinada por proteínas activadoras codificadas por la unidad E1A (Fig. 4). Esta unidad transcripcional codifica para dos ARNm durante la fase temprana de la infección y tres durante la fase tardía. Sus productos contienen tres regiones conservadas (CR1, CR2 y CR3), y no muestran dominios de unión al ADN, sino que se unen a proteínas celulares y modifican su función; estos son conocidos como trans-activadores (Russell, 2000). Estas proteínas se unen, además, a una gran variedad de factores de transcripción y proteínas reguladoras y se acoplan y activan el dominio TATA; mediante su unión con la proteína TBP “TATA binding protein”, lo que provoca un desplazamiento del supresor tumoral p53, involucrado en el control del ciclo celular (Sauthoff y col., 2002). Generalmente, los genes tempranos permanecen activos durante la replicación del ADN, aunque sus niveles de transcripción disminuye lentamente, debido a la muerte celular por apoptosis (Grand y col., 2002).

#### **II.4.6. Replicación del ADN adenoviral**

La replicación de los adenovirus se divide en dos fases. La primera fase se inicia a lo largo del ADN lineal, donde se copia una de las dos hebras. Los productos resultantes consisten en un dúplex de ADN, parental e hijo, más una hebra solitaria. En la segunda fase se sintetiza la cadena complementaria de la hebra desplazada. Posteriormente la estructura se recircula para más tarde volver a ser reconocida por la maquinaria de iniciación y así recomenzar el proceso. Los primeros 18 pb del ADN contienen un origen de replicación al que se unen proteínas celulares, como ORP-A y proteínas de origen viral como la proteína preterminal y la ADN polimerasa. La

proteína preterminal (cebador para la replicación) se une a la polimerasa y el complejo formado es capaz de reconocer secuencias específicas en el origen de replicación. La elongación de la cadena requiere dos proteínas codificadas por los genes presentes en la región E2: la propia polimerasa y las proteínas de unión a la cadena sencilla; además de una proteína celular, el factor nuclear II (Pruijn y col., 1986).

#### **II.4.7. Activación de genes tardíos**

Los genes tardíos son responsables de la síntesis de la mayor parte de las proteínas estructurales. Las regiones codificadoras de los genes tardíos en los adenovirus se encuentran organizadas en una gran unidad de transcripción. Este transcrito es procesado por utilización de sitios poli A y “splicing” diferenciales para generar al menos unos 18 ARNm distintos, que pueden ser agrupados en 5 familias: de L1 a L5 (Danthinne e Imperiale, 2000). La expresión de esta familia de ARNm es controlada por un promotor tardío, cuya actividad se incrementa a lo largo del progreso de la infección. Las cinco familias de ARNm adenovirales contienen una secuencia no codificadora en el extremo 5' de 200 nucleótidos, que es importante para el traslado de los ARNm virales durante la fase tardía de la infección y la activación selectiva de la síntesis proteica (Evans y Hearing, 2003).

#### **II.4.8. Encapsidación y salida de la célula infectada**

Durante la fase de encapsidación los trímeros de hexámeros son unidos rápidamente a los monómeros tras su síntesis en el citoplasma. La proteína L4-100 kDa media la unión y actúa como un molde sobre el que ocurre el proceso. Los pentámeros son ensamblados lentamente en el citoplasma con la fibra. El pentámero y la fibra se

ensamblan de manera independiente, para luego unirse y formar un capsómero completo. Los capsómeros se acumulan en el núcleo, donde ocurre la encapsidación. La secuencia señal de empaquetamiento está compuesta por secuencias específicas, localizadas cerca del extremo 5' y tienen la función de mediar la entrada del ADN viral a la cápsida pre-ensamblada (Parks y col., 1996). Luego del ensamblaje de la cápsida, el ADN y las nucleoproteínas se acoplan en el interior, y finalmente, se produce un procesamiento proteolítico del virión que estabiliza la partícula (Benihoud y col., 1999).

Existen al menos dos mecanismos mediante los cuales se facilita la salida de las partículas virales hacia el exterior celular. Ambos incluyen la degradación de los filamentos intermedios del citoesqueleto celular, lo que hace que la célula sea más vulnerable a la lisis. La muerte de la célula hospedante facilita la liberación de la progenie adenoviral (Doronin y col., 2003).

#### **II.4.9. Vectores adenovirales recombinantes**

Además de ser los modelos en el desarrollo de terapias suplementarias y múltiples terapias contra el cáncer, los vectores adenovirales se han empleado en terapias génicas hacia células endoteliales, renales, cardíacas, hepáticas, nerviosas, musculares y hematopoyéticas (Russell, 2000).

Los vectores adenovirales defectivos para la replicación se convirtieron en una atractiva herramienta por su capacidad de transducir eficientemente una variedad de tipos celulares, tanto en división como quiescentes. El proceso infeccioso propicia una expresión transitoria, pero muy vigorosa del ADN foráneo, ya que no se ve afectada por los efectos de inserción en regiones silentes de la cromatina. La conservación

epicromosomal del genoma viral también es muy ventajosa pues disminuye los riesgos de mutagénesis por inserción. Su uso se ha extendido, además, por su fácil multiplicación y purificación, su baja patogenicidad, la posibilidad de expresión simultánea de genes y de obtener títulos de hasta  $10^{12}$  partículas virales/mL en líneas celulares complementarias (Graham y Prevec, 1995; Kamen y Henry, 2004).

Actualmente se han desarrollado métodos eficaces para la generación de vectores adenovirales, donde el vector que contiene el casete de expresión de interés se une por recombinación homóloga a un segundo vector que contiene las secuencias adenovirales. Estos sistemas de vectores permiten la inserción de hasta 10 kb de material genético exógeno y algunos de ellos tienen incorporado el gen de la proteína fluorescente verde, lo que permite conocer la eficiencia de la transducción viral (He y col., 1998).

#### **II.4.9.1. Vectores adenovirales de primera generación**

Los vectores adenovirales más utilizados en la transferencia de genes son aquellos a los que se les ha eliminado la región génica E1 (Ad- $\Delta$ E1) y por tanto no pueden replicarse fuera de la línea celular complementaria. Los mismos han sido nombrados vectores adenovirales de primera generación y pueden presentar también cortes de varios tamaños en la región E3, que facilita la clonación de insertos mayores dentro del genoma viral (He y col., 1998). Aunque esta última región no es esencial para el crecimiento del virus *in vitro*, posee genes implicados en evadir la respuesta inmune del hospedante (Graham y Prevec, 1995).

Los adenovirus recombinantes  $\Delta$ E1 son amplificados en la línea celular de riñón humano embrionario HEK-293. Esta línea celular ha sido modificada genéticamente y expresa una copia integrada de la unidad de transcripción E1 del Adenovirus humano

serotipo 5. Así, proporciona *in trans*, las funciones de E1 para la propagación y producción a gran escala de tales vectores. Los Ad- $\Delta$ E1 no son capaces de activar las fases temprana y tardía de la transcripción a partir del genoma adenoviral recombinante. Por tanto, la expresión del transgén solamente se logra en la célula diana bajo el control de un promotor específicamente activo o constitutivo (Yang y col., 1994).

Aunque esta barrera para la expresión de genes del adenovirus es muy eficiente, no es absoluta. Una expresión limitada de genes adenovirales puede, por sí sola, afectar la fisiología de la célula diana o inducir una respuesta inmune celular (Fallaux y col., 1998). La expresión de los genes adenovirales remanentes es citotóxica “*per se*” y estimula frecuentemente una fuerte respuesta inmune contra las células infectadas (Yang y col., 1994; Yang y col., 1996; McCormick, 2001).

#### **II.4.9.2. Vectores adenovirales de segunda generación**

Una segunda estrategia fue crear vectores multidefectivos que permitieran evadir con mayor efectividad la respuesta inmune del hospedante. Se les denominan vectores adenovirales de segunda generación a aquellos que además de la región E1, se les eliminaron las regiones E2A o E4 (Lusky y col., 1998). La región E2a genera una proteína de unión específica al ADN de simple cadena que durante la fase temprana de la infección es esencial para la iniciación de la replicación viral. La región E4 codifica varias proteínas reguladoras con acción pleiotrópica en la acumulación, procesamiento y transporte de los ARNm tempranos y tardíos, en la replicación del ADN viral y en el ensamblaje de la partícula (Grave y col., 2000). Con estos vectores, a pesar del aumento en el tiempo de expresión del transgén de hasta 6 meses (Van Linthout y col., 2002), la respuesta inmune del hospedante continua siendo un problema para mantener estables los niveles de expresión.

### **II.4.9.3. Vectores adenovirales vacíos**

Se ha descrito una nueva generación de vectores adenovirales dependientes de ayudantes, en los cuales las secuencias que codifican para proteínas virales se han eliminado completamente, denominados “gutless”. Estos vectores tienen una capacidad de inserción de hasta 37 kb y son propagados en líneas celulares de empaquetamiento que expresan la recombinasa Cre (Kochanek y col., 2001). Además, se conoce que los vectores “gutless” pueden ser producidos con elevada pureza, pero los títulos virales son mucho más bajos que los obtenidos con vectores de primera y segunda generación.

Con estos vectores se logró disminuir la inmunogenicidad, obteniendo una expresión de los transgenes por períodos tan prolongados como dos años (Morral y col., 1999). Aunque se redujo considerablemente la respuesta inmune celular no puede controlar la respuesta humoral desarrollada ante las proteínas de la cápsida adenoviral. La neutralización del vector adenoviral por los anticuerpos producidos en una primera inoculación, fundamentalmente IgG e IgA, constituye un obstáculo para una segunda infección, excepto cuando el vector es liberado en compartimentos particulares como los tumores (Amalfitano y col., 1998).

## **II.5. La eritropoyetina humana**

La eritropoyetina humana es la principal hormona involucrada en la diferenciación de células madre eritrocitarias y en el mantenimiento de sus niveles fisiológicos (Krantz, 1991). Esta hormona es una glicoproteína con características ácidas, secretada por el hígado durante la etapa fetal y en el riñón del individuo adulto (Lappin y col., 2002). La EPOh fue el primer factor de crecimiento hematopoyético reconocido (Fisher, 1972),

su regulación es dependiente de los niveles de oxígeno en sangre y su expresión es controlada por el factor de transcripción inducido por hipoxia tisular HIF-1 $\alpha$  (Semenza, 1999).

La EPOh actúa sobre las células progenitoras eritroides de la médula ósea a través de la unión con receptores específicos de membrana, para estimular la proliferación y diferenciación celular. Su acción se ejerce principalmente sobre los progenitores celulares de maduración terminal, de la cascada celular eritropoiética (Spivak, 1992). Su concentración plasmática en individuos sanos es de 10-20 mUI/mL (Rege y col., 1982).

La deficiencia de hEPO en el organismo provoca anemia severa. Esta enfermedad se observa mayoritariamente en pacientes con deficiencia renal crónica y fallos renales asociados a traumas y trasplantes de riñón (McGonigle y col., 1984). La anemia provocada por la disminución de los niveles de hEPO en sangre está asociada también a los efectos de las quimioterapias en pacientes con cáncer, a los tratamientos con azidovidina en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana y a pacientes con nefropatía diabética. El suministro externo de la hormona es esencial para solucionar o minimizar los efectos de estas enfermedades (Maxwell, 2002).

El gen que codifica la hEPO se clonó en 1985 (Jacobs y col., 1985) y se obtuvieron líneas celulares de mamíferos que expresaban eficientemente la hormona con actividad hematopoyética *in vivo* (Lin y col., 1985). En la actualidad, la fuente mayoritaria de eritropoyetina humana recombinante (rhEPO) se produce en células CHO modificadas genéticamente (Weber y col., 2004; Yoon y col., 2005).

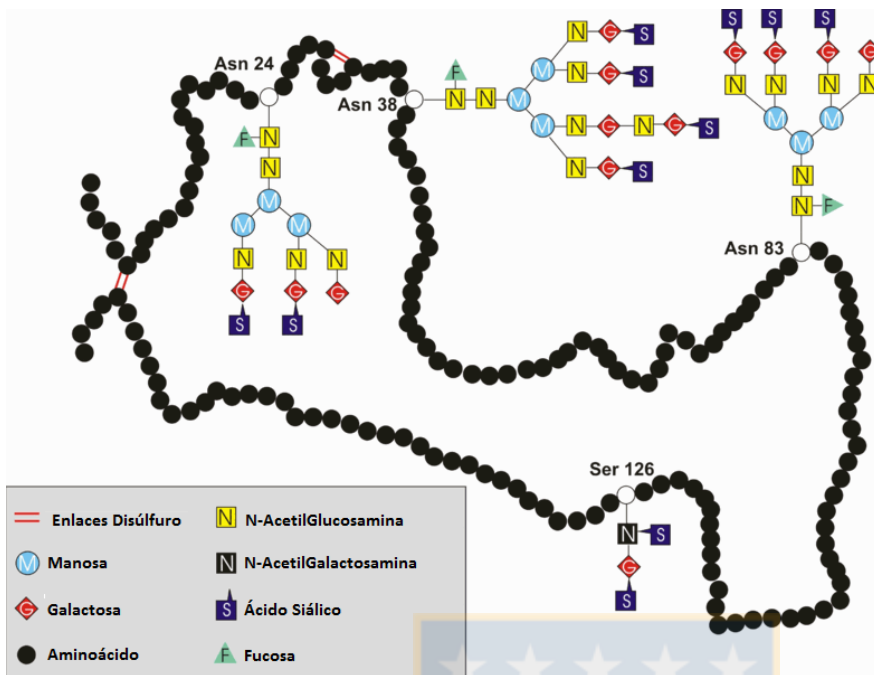
La hEPO es una glicoproteína de 165 aminoácidos con una talla molecular estimada de 37 kDa, la molécula posee dos puentes disulfuro internos entre las cisteínas 7-161 y 29-33, que son muy importantes en el mantenimiento de la actividad biológica (Lai y col., 1995). La glicoproteína posee tres sitios potenciales de N-glicosilación, localizados en las posiciones Asn-24, Asn-38 y Asn-83 y un sitio de O-glicosilación en el residuo Ser-126 (Dordal y col., 1985). La fracción proteica constituye el 60% de la molécula y el contenido de carbohidratos el 40% (Semenza, 1999).

Los oligosacáridos N-enlazados a la EPOh presentan estructuras del tipo complejo (Fig. 2 C). Las estructuras mayoritarias corresponden a tetrantenas con terminaciones NeuAc $\alpha$ 2-6 y no se presenta GlcNAc unida al Man $\beta$  del núcleo, se encuentran además estructuras bi y tri antenarias pero en mucho menor proporción. La carga negativa que aporta el ácido siálico es la responsable de las propiedades ácidas de la molécula, la cual presenta un punto isoeléctrico entre 3.31 y 4.11, que corresponde a una concentración de entre 9.5-13.9 mol de ácido siálico/mol de hEPO (Morimoto y col., 1996).

### **II.5.1. Relación entre la actividad biológica y la glicosilación**

La EPOh se une a las células eritroides a través de un receptor de membrana específico y saturable, el cual forma parte de los receptores de citoquinas clase I (Winkelmann, 1992). La interacción de la EPOh con su receptor desencadena una gama de respuestas que regulan la supervivencia, la proliferación y la diferenciación celular.





**Fig 4.** Estructura primaria de la Eritropoyetina humana (hEPO). Esquematación de los tres sitios de N-Glicosilación en los residuos de asparagina 24, 38 y 83 con estructuras tetra-antenarias y del sitio único de O-glicosilación en el residuo de serina 126. Imagen obtenida de <http://eritropoyetina.com> .

La ruta de transducción de la información desde la membrana celular al núcleo se activa mediante la cascada de señalización: Janus 2 quinasa / transductor de señal y activador de la transcripción 5 (JAK2/STAT5) (Okutani y col., 2001), en la que JAK 2 está asociada de forma constitutiva al receptor. Este se ha detectado además, en diversos tipos celulares como las células endoteliales (Ribatti y col., 1999), células del músculo liso (Ammarguella y col., 2001), neuronas (Lewezuk y col., 2000), astrocitos y microglías (Nagai y col., 2001).

Como se ha descrito en trabajos anteriores, el contenido de ácido siálico es necesario para el mantenimiento de la actividad hematopoyética de la hEPO *in vivo* (Dordal y col., 1985; Elliot y col., 2004). La EPOh recombinante, obtenida a partir de células

CHO y enriquecida en estructuras tetrantenarias sialiladas producto del proceso de purificación, muestra una actividad hematopoyética *in vivo* equivalente a la EPOh nativa, pero una baja actividad *in vitro*. Sin embargo, la fracción básica de la hEPO recombinante muestra tres veces más actividad *in vitro* con relación a la glicoproteína humana nativa, pero muy baja actividad *in vivo* (Misaizu y col., 1995).

Las cadenas de oligosacáridos enlazados a la hEPO incrementan su talla e impiden que sea filtrada a través de los riñones. La presencia de ácido neuramínico terminal impide que se expongan residuos de galactosa que son reconocidos por receptores de estos monosacáridos presentes en el hígado. Esto determina el tiempo de vida media de la glicoproteína en sangre.

La hEPO más básica es eliminada del plasma 20 veces más rápido que la molécula que posee un elevado contenido de ácido siálico (Fratantoni y Seamon, 1994). Además, la glicosilación es necesaria para el transporte plasmático de la hormona y para su paso desde la sangre hacia la médula ósea, a través de las células endoteliales de la barrera sangre-médula ósea. La composición y estructura de los carbohidratos determinan la estabilidad conformacional de la molécula y sus características de unión al receptor (Darling y col., 2002).

Existen evidencias de que la hEPO está relacionada con la fisiología del Sistema Nervioso Central y con efectos neuroprotectores bajo circunstancias de hipoxia o isquemia (Lewezuk y col., 2000; Olsen, 2003). La hEPO encontrada en el SNC se produce por dos tipos celulares que sostienen el sistema paracrino de la hormona, las neuronas y los astrocitos (Marti y col., 1996). La glicoproteína circulante producida en los riñones no puede cruzar la barrera hematoencefálica por su elevado peso molecular. Sin embargo, se ha comprobado que la EPOh producida en los astrocitos de ratas presenta menor peso molecular, comparada con la isoforma circulante, lo

que puede estar asociado a un menor contenido de ácido siálico. Este hecho apoya el concepto de acción paracrina en el cerebro, debido a que la hEPO en el plasma sanguíneo necesita de una extensa sialización para evitar su eliminación en los riñones y el hígado e incrementar el tiempo de vida media en sangre (Masuda y col., 1994).

## **II.6. Proteínas de Fusión y su uso como biofármacos.**

Las proteínas de fusión o proteínas quiméricas son proteínas creadas a través de la unión de dos o más genes que codifican para proteínas independientes. La traducción de esta secuencia genómica codifica para un único polipéptido con propiedades funcionales derivadas de cada una de las proteínas originales (Dumont y cols, 2014). Así, proteínas de fusión recombinantes han sido sintetizadas artificialmente mediante la tecnología de ADN recombinante para su uso en investigación o la terapéutica biológica (Oliveira y cols, 2013). El propósito de la creación de proteínas de fusión sintéticas en el desarrollo de biofármacos es el de mejorar las propiedades y funcionalidad de un péptido mediante la incorporación sinérgica de múltiples proteínas en un solo complejo. Estudios previos, han reportado que la fusión de dos o más dominios proteicos, permiten potenciar la actividad biológica del fármaco recombinante o generar nuevas combinaciones funcionales con un amplio rango de aplicaciones biotecnológicas (Yu y cols,2015).

Hasta el año 2008 han sido aprobadas seis proteínas de fusión para su uso terapéutico (Aggarwal y cols, 2008). Un ejemplo particular, es Etanercept, que se compone de un fragmento de 75kDa proveniente del receptor de TNF- $\alpha$  humano unido al fragmento Fc de la inmunoglobulina humana de clase I (Ducharme y cols, 2008). Este biofármaco que posee un amplio rango de aplicación y se encuentra

disponible en el mercado desde 1998. Posteriormente se aprobó el uso de Denileukin diftox, un biofármaco que consiste en el dominio de transmembrana de la toxina diphtheria unida a interleuquina 2 humana (IL-2), y que cuyo blanco terapéutico corresponde a células cancerígenas malignas que sobre-expresan el componente p55 (CD25) del receptor de IL-2 humano.

### **II.6.1. Diseño de secuencias espaciadoras.**

Se ha descrito que la incorporación de péptidos espaciadores flexibles presentes entre las secuencias primarias de la proteína de fusión permite el plegamiento independiente de cada una de las subunidades, conserva adecuadamente la función fisiológica de ambas proteínas y disminuyendo la citotoxicidad asociada al polipéptido recombinante (Klement y cols, 2015). En consecuencia, el diseño, análisis y predicción *in silico* del número óptimo de aminoácidos presentes en la secuencia espaciadora mediante herramientas de dinámica y docking molecular (Wu y cols, 2013), resulta fundamental en la estabilidad y funcionalidad de la molécula recombinante (Kleins y cols, 2014). Adicionalmente, el estudio *in silico* de los espaciadores permite la incorporación de sitios de escisión para proteasas o agentes químicos con el objetivo de la separación de ambas proteínas ( Chng y cols, 2015). Las herramientas anteriormente descritas, han permitido la expresión de proteínas quiméricas unidas a proteína GST (Eirnarson y cols, 2007), péptido FLAG (Siegemund y cols, 2013) u otros péptidos específicos que permitan la purificación de la proteínas mediante cromatografía de afinidad.

**Tabla 4.** Proteínas de Fusión aprobadas para su uso terapéutico (Schimdt y cols, 2009)

Fármaco	Aprobación	Compañía	Enfermedad	Mecanismo de acción	Blanco	Proteína 1	Proteína 2	Ref.
<b>Etanercept (Enbrel)</b>	Noviembre 1998	Amgen Inc	Reumatismo, Artritis, Psoriasis	Inhibidor de TNF	TNF $\alpha$ y $\beta$	P75 TNF $\alpha$ R	IgG1 Fc	Duchame (2008)
<b>Denileukin Diftitox (ontak)</b>	Febrero 1999	ElSal Co Ltd	Linfoma cutáneo	Inhíbe Expresión de receptor IL-2	Receptor de IL-2	IL-2	Toxina de Difteria	Tutturro (2007)
<b>Alefacept (Amevive)</b>	Enero 2003	Astellas Pharma	Psoriasis	Inhibición de células T activadas	CD2	LFA-3	IgG1 Fc	Strober (2007)
<b>Abatacept (Orencia)</b>	Febrero 2006	Bristol-Meters	Atritis Reumatoide	Artritis Reumatoide	CD80, CD86	CTLA-4	IgG1 Fc	Lundquist (2007)
<b>Rilonacept (Arcalyst)</b>	Febrero 2008	Regeneron	Síndrome Periódico	Inhibidor de IL-1	de IL-1	Receptor IL-1	IgG1 Fc	Hoffman (2008)
<b>Romiplstim (Nplate)</b>	Agosto 2008	Amgen Inc	Trombocitopenia purpura	Estimulador de biosíntesis de plaquetas	Receptor de la TPO	TPO	IgG1 Fc	Cines (2008)

## II.6.2. Proteínas de fusión-Fc.

Un gran número de proteínas efectoras utilizadas como biofármacos, presenta una corta vida media en circulación producto de su bajo peso molecular. Así, su rápida eliminación del torrente sanguíneo, acota significativamente su ventana terapéutica y por tal motivo, se requieren dosis frecuentes del biofármaco para preservar su actividad biológica (Schimdt y cols, 2009). En consecuencia, se han empleado diversas estrategias para incrementar el tiempo en circulación de dichos biofármacos, lo que ha derivado en el diseño y expresión de diversas proteínas de fusión compuestas por la proteína efectora y el fragmento Fc de inmunoglobulinas, albúmina

y transferrinas (Farmer y cols, 2005). Es así, como estudios anteriores han demostrado que la adición del Fragmento Fc de inmunoglobulinas es suficiente para proveer a la proteína de fusión, funciones inmunes y una vida media extendida producto de la vía de reciclamiento de anticuerpos asociada al receptor neonatal del fragmento Fc (Fc-Rn), expresado constitutivamente en tejidos derivados de intestino, pulmón e hígado (Lencer y cols, 2005). Otras ventajas en el diseño de proteínas de fusión-Fc, resultan en su secreción estable al medio de cultivo en forma soluble mediante la vía de procesamiento y secreción de anticuerpos, la solubilización de proteínas hidrofóbicas y un incremento en la avidéz de ligandos multivalentes producto de la conformación dimérica de la proteína quimérica. Actualmente, más de 12 proteínas de fusión-Fc se encuentran en fase de ensayos clínicos para su posterior aprobación y uso terapéutico, tales como Factor IX-Fc (Dumont y cols, 2006), VGFR1-Fc (Rieily y cols, 2007), FGFR1-Fc (Zhang y cols, 2007), CTLA4-Fc (Vicenti y cols, 2005), TACI-Fc (Gatto y cols, 2008) entre otras.

En contraparte, las desventajas asociadas al diseño de proteínas de fusión-Fc radican en su alto costo productivo, debido a la necesidad de su expresión en cultivos de células de mamífero (Khawli y cols, 2008). Además, se ha identificado que elevadas concentraciones plasmáticas del fragmento Fc de inmunoglobulinas son capaces de generar toxicidad a través de mecanismos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) mediado por la interacción del dominio CH2 receptores de Fc- $\gamma$  en la superficie de células efectoras inmunes que dirigen las funciones de fagocitosis o lisis (Bouman y cols, 2008). Sin embargo, proteínas quiméricas unidas al fragmento Fc de anticuerpos, no han demostrado un efecto de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) debido a que carecen del dominio CH1 y la región bisagra necesarios para la activación de dicho proceso (Mitoma y cols, 2008).

En base a todos los antecedentes anteriormente expuestos, nos planteamos la siguiente pregunta de investigación.

*¿Podrá una alternativa molecular quimérica derivada de la eritropoyetina humana potenciar su actividad hematopoyética, aun cuando la hormona se exprese en células epiteliales de la glándula mamaria de cabras?*

Para responder a la pregunta de investigación, el presente estudio tiene como **hipótesis:**



## HIPÓTESIS

*“Una alternativa molecular quimérica derivada de la eritropoyetina humana que incremente su talla molecular potenciaría su actividad hematopoyética, aún cuando la hormona se exprese en células epiteliales de la glándula mamaria de cabras.”*

### OBJETIVO GENERAL:

*“Expresar y caracterizar una alternativa quimérica de la hEPO recombinante en la leche de cabras genéticamente modificadas, evaluando su actividad hematopoyética in vivo.”*

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Diseñar mediante modelación molecular una variante quimérica derivada de la hEPO y del fragmento Fc de la inmunoglobulina G humana.
2. Generar un vector adenoviral recombinante que exprese la variante quimérica diseñada y evaluar su capacidad de expresión en cultivos celulares.
3. Caracterizar las alternativas producidas mediante transducción adenoviral *in vitro* e *in vivo* en la glándula mamaria de cabras.
4. Comparar la actividad hematopoyética *in vivo* de la glicoproteína quimérica expresada en la glándula mamaria y en la línea celular humana SiHa.



### **III. MATERIALES Y METODOS**

#### **III.1 MATERIALES**

##### **III.1.1. Cepas bacterianas**

La cepa de *Escherichia coli* TOP 10 se utilizó en este trabajo en las diferentes etapas de clonación, como cepa amplificadora de vectores plasmidiales de interés.

*Top 10*: F' [*lacI*<sup>q</sup> Tet<sup>r</sup>] *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80/*lacZ*  $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *deoR* *recA1* *araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* *endA1* *nupG*

La cepa de *Escherichia coli* BJ5183 (AdEasy™-Vector System, QuantumBiotechnologies, EE.UU) se utilizó durante la generación de los vectores adenovirales, específicamente para mediar la recombinación homóloga entre el vector de transferencia y el plasmidio que contenía el genoma adenoviral.

*Escherichia coli* BJ5183: *endA* *sbcBC* *recBC* *galK* *met* *thi-1* *bioT* *hsdr* [Str<sup>r</sup>].

##### **III.1.2. Líneas celulares**

Las líneas celulares descritas a continuación se utilizaron fundamentalmente para la amplificación de vectores adenovirales y para la expresión de proteínas recombinantes.

HEK-293A: células de riñón de embrión humano (ATCC CRL 1573).

SiHa: células derivadas de carcinoma de útero humano (ATCC HTB-35).

GMEC: células epiteliales mamarias de cabra (*Capra hircus*) aisladas de un cultivo primario de glándula mamaria. Donadas en el Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos, Universidad de Concepción, Chile.

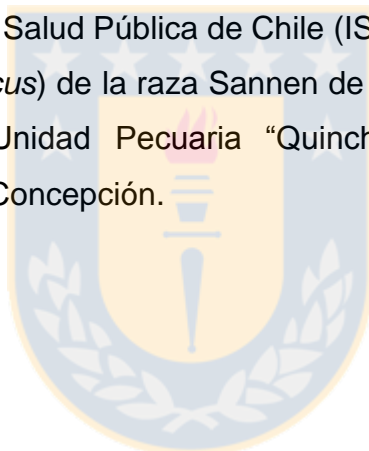
HC11: células epiteliales mamarias de ratón resistentes a higromicina, donadas por el Dr. Jeff Rosen (“Baylor Collage of Medicine”, Houston, EE.UU). Propiedad intelectual del Dr. Bernd Gröner (“Deutsche Cancer Institut”, Freiburg, Alemania).

### III.1.3. Animales

En el presente trabajo se utilizaron ratones y cabras para la expresión de proteínas recombinantes en la leche y ratones como modelo para ensayos de actividad biológica.

**Ratones:** Ratones (*Mus musculus*) de la línea C57-BL6 de 6 semanas de vida, procedentes del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP).

**Cabras:** Cabras (*Capra hircus*) de la raza Sannen de 1 y 2 años de edad, disponibles en los criaderos de la Unidad Pecuaria “Quinchamalí”, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.



### III.1.4. Medios de cultivo.

La composición de los diferentes medios de cultivos requeridos en los experimentos se relaciona a continuación.

#### III.1.4.1 Medio para el cultivo de bacterias.

**LB:** triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7.5. Para el medio LB sólido se añade agar bacteriológico 15 g/L (Gibco-BRL, EE.UU).

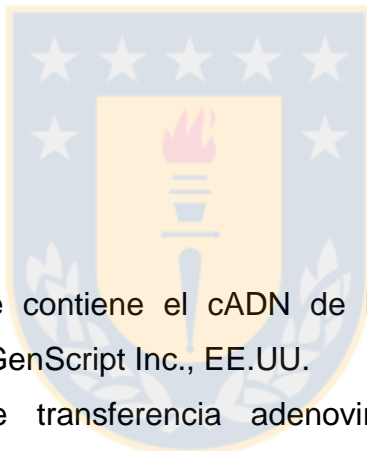
### III.1.4.2 Medios para el cultivo de células de mamíferos

Medio mínimo (DMEM): Medio Mínimo Esencial Dulbecco (Gibco-BRL, EE.UU), suplementado con L-glutamina 0.3 mg/mL, piruvato sódico 1 mM y solución antibiótico-antimicótico 1X (Gibco-BRL, EE.UU).

Medio de crecimiento: DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10%, (Gibco-BRL, EE.UU).

Medio de inducción: DMEM suplementado con insulina 5 ug/mL, hidrocortisona 1 ug/mL y prolactina 1 ug/mL. Las tres hormonas fueron obtenidas a través de la casa comercial Gibco-BRL, EE.UU.

Medio de congelación: DMEM suplementado con dimetilsulfóxido 10% (Sigma, EE.UU) y SFB 20%.



### III.1.5. Plasmidios

pMinus-Epo-Fc: vector que contiene el cADN de la proteína quimérica EPO-Fc, sintetizado por la empresa GenScript Inc., EE.UU.

pAdTrack-CMV: vector de transferencia adenoviral (AdEasy<sup>TM</sup>-Vector System, QuantumBiotechnologies, EE.UU). Posee un sitio de clonaje múltiple bajo el control de un promotor CMV donde se inserta el gen de interés y contiene una unidad transcripcional constitutiva para el gen de la proteína verde fluorescente (GFP), que permite evaluar la transfección adenoviral. Contiene una unidad transcripcional de expresión propio de procariontes que le confiere resistencia a kanamicina (Kan).

pAd-EASY-1: vector de 33.4 kb que contiene el genoma del adenovirus humano serotipo 5 (Ad-5) con la región E1 (Ad-5 nucleótidos del 1 al 3533) y la región E3 (Ad-5 nucleótidos del 28, 30-130, 820) eliminadas (AdEasy<sup>TM</sup>-Vector System,

QuantumBiotechnologies, EE.UU). Posee además un segmento de ADN que contiene el origen de replicación del pBR322 y un gen de resistencia a ampicilina (Amp).

### III.1.6. Enzimas, proteínas de referencia y anticuerpos

Endonucleasas de restricción: Las endonucleasas de restricción utilizadas provinieron de la casa comercial New England Biolabs (Inglaterra) y fueron manipuladas según las recomendaciones de los fabricantes.

hEPO comercial: Eritropoyetina comercial 55,ug/mL (Recormon<sup>®</sup>, Chile).

$\alpha$ IgG ratón-HRP: anticuerpo policlonal contra la IgG de ratón, conjugado con HRP (AbCam,EE.UU).

$\alpha$ IgG cabra-HRP: anticuerpo policlonal contra la IgG de cabra, conjugado con HRP (CIGB-Sancti-Spíritus).

$\alpha$ EPO ratón anticuerpo monoclonal contra la EPOh elaborado en ratón, (AbCam,EE.UU).

$\alpha$ EPO cabra: anticuerpo monoclonal contra la EPOh elaborado en cabra, (AbCam, EE.UU)

$\alpha$ IgG humano-NIR: anticuerpo monoclonal contra el fragmento Fc de la IgG humana conjugado con NIR (Jackson, EE.UU.)

### III.1.7. Soluciones

Las soluciones y tampones utilizados en el presente trabajo se prepararon de acuerdo a las siguientes formulaciones.

Avertín: 1,25g de Tribometanol a 2,5mL de 2-Metil-Butanol y calentado a 55°C, posteriormente se llevó a 100 mL con H<sub>2</sub>O pura y fue filtrado por 0,22  $\mu$ m.

PBS: Tampón fosfato-salino, NaCl 8 g/L, KCl 0.2 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.09 g/L, pH 7.2.

PBS-EGTA: Tampón fosfato-salino, NaCl 8 g/L, KCl 0.2 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.09 g/L, EGTA 3, mM pH 7.2.

PBS-Tween: Solución de lavado para *Western blot*, tween-20 al 0.05% disuelto en tampón PBS.

Tris-CaCl<sub>2</sub>: Tampón de separación de leche, Tris base 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 8.0.

Tris-Glicina: Tampón para electroforesis de proteínas, glicina 144 g/L, Tris base 30 g/L, SDS 0.1%, pH 8.3.

Solución tampón denaturante: glicerol 10%, SDS 2%, B-mercaptoetanol 5%, Tris-base 0.0625 g/L, bromofenol azul 0.001%, pH 6.8

Solución tampón de transferencia para *Western blot*: Tris base 5.8 g/L, glicina 2.9 g/L, metanol 20%, pH 9.2.

Solución de bloqueo: leche descremada al 5% diluida en tampón PBS.

Solución tampón sustrato DAB: diamino bencidina (DAB) 0.75 mg/mL, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.03%, disueltos en tampón PBS.

Solución de Rojo Ponceau: Ponceau S 20 g/L (Sigma, EE.UU); ácido tricloroacético (TCA) 300 g/L (SIGMA, EE.UU.), ácido sulfosalicílico 300 g/L (Merck, Alemania).

Tampón de Equilibrio: Tris Base 20mM , NaCl 0.25 M , pH 8.

Tampón de Elución: Glicina 0.1 M , NaCl 0.25M , pH 3.

Tampón de Neutralización: Tris Base 1M, pH 8.

## III.2. MÉTODOS

### III.2.1. Técnicas básicas de genética molecular

Los procedimientos generales requeridos para la evaluación y el manejo del ADN se realizaron de acuerdo a lo descrito por Sambrook y col. en 1989. Las digestiones de ADN con las enzimas de restricción se realizaron de acuerdo a las recomendaciones de las casas comerciales. Los cebadores empleados se sintetizaron en el CIGB con el

sistema automático “Gene Assembler Plus DNA Synthetizer” (Pharmacia-LKB, Suecia) por el método del  $\beta$ -cianoetilfosforamidito (Sinha y col., 1983). Las electroforesis de ADN se efectuaron en geles de agarosa al 0,8, al 1% o al 1.5% peso/volumen (p/v) en tampón TBE a 5 V/cm, según las exigencias necesarias. La recuperación de fragmentos de ADN a partir de los geles de agarosa se hizo según los juegos de reactivos “QIAquick Gel Extraction Kit” (Qiagen, EE.UU).

### **III.2.2. Transformación de *Escherichia coli***

La preparación de las células competentes a partir de *E. coli* y su transformación con plásmidos se realizó según el método de la electroporación establecido por Sharma y Schimke, 1996.

### **III.2.3. Aislamiento de ADN plasmídico**

La purificación del ADN de los plásmidos de *E. coli* se realizó mediante el método de lisis alcalina descrito por Birnboim y Doly en 1979. Para la transfección de células de mamíferos los plásmidos se purificaron mediante el juego de reactivos “E.N.Z.A. Plasmid Midi and Maxi Purification Kits” (Omega-Biotek, EE.UU.).

### **III.2.4. Técnicas básicas para el cultivo de células de mamífero.**

#### **III.2.4.1. Descongelación**

El proceso se realizó de forma rápida, el vial que contenía las células se descongeló en un baño a 37°C con agitación. Posteriormente las células se lavaron con medio DMEM y se centrifugaron a 106 g durante 5 min. El sobrenadante se decantó y el precipitado celular se resuspendió en medio de crecimiento. Las células se sembraron

en frascos para cultivo adherente (Falcon, EE.UU.) y se incubaron a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5% y humedad relativa del 95%.

#### **III.2.4.2. Cambio de medio**

El medio de cultivo se cambió teniendo en cuenta la densidad celular y el pH del medio, se utilizó medio DMEM para las líneas celulares HEK-293 y SiHa. Para las células GMEC se usó DMEM-F12. Ambos suplementados con L-glutamina (0.3 mg/ml), piruvato sódico (1 mM) y antibiótico-antimicótico (10 000 U de penicilina, 10 000 µg estreptomina y 25 µg anfoterisina) 100X (GIBCO, EE.UU), más 10% de suero bovino fetal (SFB). El medio de cultivo metabolizado se extrajo mediante aspiración con pipetas Pasteur de vidrio, las células se lavaron con 6 mL/placa de PBS (Tampón fosfato-salino, NaCl 8 g/L, KCl 0.2 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.09 g/L, pH 7.2) y se adicionó medio fresco DMEM acondicionado con suero fetal bovino(SFB) al 5%, previamente calentado a 37° C.

#### **III.2.4.3. Propagación**

Una vez que el cultivo alcanzó un 95% de densidad celular en monocapa, se eliminó el medio de cultivo y las células se lavaron dos veces con un volumen de PBS. Se añadió solución de tripsina 0.25% y EDTA 0,01% y se incubó en las condiciones descritas durante 5 min. Las células se resuspendieron en medio de crecimiento y se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 min. El precipitado celular se resuspendió en 5 ml de medio de crecimiento fresco. Posteriormente se preparó la dilución a sembrar utilizando el mismo medio. Las células se sembraron en placas o frascos de cultivo y se incubaron en las mismas condiciones.

#### **III.2.4.4. Conteo de células viables**

Después de incubar las células durante 2 min con tripsina-EDTA al 0.25%, se llevaron a un volumen deseado con DMEM suplementado con SFB al 10%. Se realizó una dilución 1:10 del medio con células en el colorante tripan azul al 0.5% (5 g/L tripan azul; 8.5 g/L NaCl), garantizando la resuspensión en un tubo eppendorf. Se presentó la dilución al cubreobjeto sobre la cámara de Neubauer la cual se llenó por capilaridad y hasta cubrir la cámara. Se contaron las células negativas a la tinción por campo en microscopio óptico. Se calculó la concentración de células por mL según la fórmula:  $C = N \times 10^4 \times D$ , donde N es el total de células contadas,  $10^4$  es el factor constante de la cámara y D la dilución.

#### **III.2.4.5. Congelación**

Las células se propagaron hasta obtener una monocapa celular con una densidad del 70%. Luego se individualizaron mediante un tratamiento con solución de tripsina-EDTA a 37°C durante 2 min. Las células desprendidas del frasco de cultivo se resuspendieron en medio de crecimiento y se centrifugaron a 106 g durante 5 min. Finalmente se resuspendieron en medio de congelación, previamente enfriado a 4°C, y se distribuyeron en criotubos de 1 mL (Sigma, EE.UU) incubados en hielo. Posteriormente los criotubos se incubaron a -70°C durante 24 h y finalmente se conservaron en tanques de nitrógeno líquido.

#### **III.2.4.6. Transfección en cultivos celulares**

Las células HEK-293A se sembraron a una confluencia del 40% en medio de crecimiento y se continuó el cultivo hasta alcanzar una confluencia celular del 80%.



Una hora antes de comenzar el ensayo de transfección se cambió el medio de crecimiento por medio DMEM fresco. Como reactivo de transfección se utilizó lipofectamina, de la casa comercial Invitrogene, EE.UU.

El ADN y la lipofectamina se diluyeron por separado en medio DMEM. El ADN se usó en una proporción de 1  $\mu\text{g}$  por cada  $10^6$  células y el volumen final se ajustó a 250  $\mu\text{L}$  con medio DMEM y se dejó reposar a 25°C durante 10 min. Se utilizaron 4  $\mu\text{L}$  de lipofectamina por cada  $\mu\text{g}$  de ADN y el volumen final también se llevó a 250  $\mu\text{L}$  con medio DMEM y se dejó reposar a 25°C durante 10 min. Pasado este tiempo se unieron ambas diluciones, se mezclaron varias veces con la micropipeta y se dejaron reposar a 25°C durante 30 min. Posteriormente se añadió la mezcla a la monocapa celular y se incubó a 37°C durante 12 h. Finalmente se sustituyó el medio anterior por medio de cultivo fresco y las células se dejaron crecer hasta el 100% de confluencia celular.

### **III.2.5. Generación vectores adenovirales con la variante EPO-Fc**

#### **III.2.5.1. Clonación del gen de la EPO-Fc en el vector pAdTrack-CMV**

El ADNc de la EPO-Fc presente en el vector pM13-EPO-Fc se digirió con las endonucleasas *EcoRV* y *KpnI* y el segmento de ADN resultante se subclonó en los sitios de restricción *EcoRV*||*KpnI* del vector pAdTrack-CMV. El plásmido recombinante resultante pAdTrack-se denominó EPO-Fc.

### **III.2.5.2. Generación de los genomas adenovirales por recombinación homóloga**

La inserción de la unidad transcripcional de interés en el genoma adenoviral se realizó mediante recombinación homóloga en la cepa de *E. coli* BJ5183. El vector de transferencia recombinante se llevó a su conformación lineal mediante una digestión enzimática con la endonucleasa de restricción *PmeI* y se co-electroporó con el plásmido pAd-EASY-1 en la cepa BJ5183, en una proporción de 1ug de vector lineal y 100 ng de pAd-EASY-1. Los genomas recombinantes se identificaron mediante digestión con la endonucleasa *PacI*. Los plásmidos recombinantes se transformaron en la cepa de *E. coli* TOP 10 y se purificaron mediante el conjunto de reactivos “E.N.Z.A. Plasmid Midi and Maxi Purification Kits” (Omega-Biotek, EE.UU.).

### **III.2.5.3. Generación de los viriones Adenovirales AdEPO-Fc**

Los viriones adenovirales recombinantes se generaron mediante la transfección del genoma adenoviral recombinante en la línea celular HEK-293A. Con el objetivo de liberar el genoma adenoviral de la secuencia de origen bacteriano, se digirieron 20 µg del vector plasmídico pAdEasy-E2his con la endonucleasa *PacI*, y el producto de la digestión se transfectó en las células HEK-293A, previamente crecidas hasta un 70% de confluencia en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (Falcon, EE.UU.). La transfección se realizó empleando el reactivo lipofectamina (Invitrogen, EE.UU), acorde a las instrucciones del fabricante. La eficiencia de la transfección se comprobó por la presencia de la GFP en las células transfectadas mediante observación directa del cultivo en el microscopio de fluorescencia (Olympus YX-81) con una magnificación de 100X. El cultivo se mantuvo en monocapa celular confluyente durante 7 días y se añadió medio fresco a intervalos de 3 días. La presencia de viriones infectivos se hizo evidente por la formación de halos de lisis alrededor de las células fluorescentes. Los vectores virales resultantes se denominaron AdEPO-Fc.

#### **III.2.5.4. Amplificación de los vectores adenovirales**

La multiplicación de los viriones se desarrolló en la línea de empaquetamiento adenoviral HEK-293 cultivadas con medio DMEM +SFB al 10% en placas de 100 mm<sup>2</sup>, con una confluencia cercana al 80%. Tras 8 h de infección, se cambió medio a DMEM s/SFB y luego de 48 h post-infección, el cultivo se desprendió del frasco y las mezclas de células se rompieron mediante tres pases sucesivos de congelación-descongelación, de -20°C a 37°C, seguido de agitación vigorosa. La muestra se centrifugó a 10621 g y el sobrenadante se almacenó a -70°C hasta su titulación.

#### **III.2.5.5. Titulación de los vectores adenovirales**

La titulación de las muestras adenovirales y lentivirales se realizó mediante diluciones seriadas en base 5 (40/200) en una placa de 96 pocillos. Se tomaron 40 µL de cada una de las diluciones y se transfirieron a una placa de cultivo de 96 pocillos, previamente sembrada con una densidad celular de  $5 \times 10^4$  células HEK-293A por pocillo. Las células se incubaron a 37°C, CO<sub>2</sub> al 5% y humedad relativa del 95% durante 48 h, luego se contó en el microscopio de fluorescencia el número de células que expresan GFP en los pocillos.

Se definió como una partícula viral o unidad formadora de color (UFC) a la máxima dilución en la cual se visualizó al menos una célula fluorescente por pocillo. El resultado de estos conteos se promedia y se multiplica por la dilución para obtener el título viral, el cual se expresa en UFC/mL.

### **III.2.6. Transducción adenoviral en cultivos celulares de mamíferos**

#### **III.2.6.1. Selección de multiplicidad de infección en GMEC y SiHa.**

Para realizar este ensayo se sembraron tres placas diferentes con una densidad de  $1 \times 10^5$  células por pocillo en una placa de 12 pocillos. Cada placa contuvo células SiHa o GMEC, respectivamente. Pasadas 24 h cada muestra de células, con una confluencia cercana al 80%, se transdujeron con diferentes multiplicidades de infección (MOI) del vector adenoviral. Las células SiHa se cultivaron con medio DMEM +SFB 10% antes de la infección con el vector Ad-EPO-Fc, mientras que las células GMEC se cultivaron con medio DMEM-F12 +SFB 10%. Posteriormente se transdujeron 5 pocillos de cada placa con cantidades crecientes del vector viral, que correspondían a 5, 14, 25, 70 y 210 partículas virales por célula. Se mantuvieron 7 pocillos sin transducción a modo de control negativo. Pasadas 8 h de transducción, se cambiaron los medios a medio sin SFB, para finalmente evaluar la expresión de GFP y el efecto citopático a las 16 y 96 h post-transducción, en el microscopio de fluorescencia Olympus YX-81. Finalmente, se colectó el medio de cada pocillo por separado y se centrifugó a 2236 rpm durante 10 min, y el sobrenadante se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **III.2.6.2. Expresión de proteínas recombinantes en cultivos celulares mediada por vectores adenovirales**

La expresión de proteínas recombinantes en cultivos celulares se realizó en frascos de cultivo de 75 (Falcon, EE.UU) con capacidad para  $5 \times 10^7$  células. El cultivo se amplificó hasta un 95% de confluencia en 300 mL de medio de crecimiento. Posteriormente se cambió el medio de crecimiento por 200 mL de medio DMEM y se

inoculó el vector adenoviral a una MOI de 25. Las células se cultivaron durante 80 h y finalmente se cosechó el medio para su posterior análisis.

### **III.2.7. Expresión de la proteína EPO-Fc en la leche de cabra**

#### **III.2.7.1. Inducción de lactación en cabra**

La inducción se realizó en tres cabras nulíparas, según el método descrito por Cammuso y col., 2000. La edad de los animales oscilaba entre 1 y 1.5 años. Durante los primeros 13 días del ensayo se administró progesterona (Sigma, EE.UU.) 0.75 mg/kg de peso/animal y  $\beta$ -estradiol (Sigma, EE.UU.) 0.25 mg/kg de peso/animal. La inoculación se realizó en días alternos y por vía intramuscular. Pasados 5 días del tratamiento, se dieron dos masajes mamarios diarios, hasta el término del ensayo. En los días del 14 al 16 se administró prednisolona (Sigma, EE.UU.) 0.4 mg/kg de peso/animal, también por vía intramuscular.

#### **III.2.7.2. Infusión adenoviral en la glándula mamaria de cabra**

Para realizar los ensayos de infusión adenoviral en la glándula mamaria las cabras se ordeñaron de forma manual hasta lograr el secado total de las ubres. Se introdujo un catéter, acoplado a una jeringuilla de 50 mL, a través del canal del pezón hasta la cisterna de la glándula mamaria. Mediante el catéter se infundió tampón PBS-EGTA (26mM) estéril a la cisterna, hasta que se llenó totalmente. Se realizó un masaje exhaustivo de la glándula mamaria y se escurrió el contenido de las ubres. Este proceso de lavado se repitió dos veces. Finalmente, se infundió la solución que contenía el vector adenoviral AdEPO-Fc a un título de  $1 \times 10^9$  UFC/mL, hasta repletar el contenido de la cisterna de la ubre derecha y se tomó la ubre izquierda como

control negativo para la expresión de EPO-Fc. Pasadas 24 h se escurrió exhaustivamente el contenido de las ubres mediante ordeño manual y a partir del día 2 después de la transducción, los animales se ordeñaron diariamente.

### **III.2.7.3. Tratamiento de la leche**

La leche colectada, tanto de ratón como de cabra, se conservó a  $-20^{\circ}\text{C}$  después de cada ordeño. Las muestras de leche se diluyeron cinco veces en tampón Tris- $\text{CaCl}_2$  y se centrifugaron a 10621 g durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se obtuvo una fase líquida correspondiente al suero, una capa superior de grasa y un precipitado insoluble correspondiente a las caseínas que se desechó. El suero se extrajo cuidadosamente con la pipeta y las muestras se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

### **III.2.8. Técnicas de manipulación e identificación de proteínas**

#### **III.2.8.1. Precipitación de proteínas con TCA- deoxicolato de sodio**

A la muestra se le adicionó deoxicolato de sodio (1.5 mg/ml) en una proporción de  $1/10$  y se agitó vigorosamente durante 1 min, se dejó reposar 10 min a  $25^{\circ}\text{C}$ . Se agregó  $1/10$  de ácido tricloroacético (TCA), se agitó fuertemente 1 min y se deja reposar a  $25^{\circ}\text{C}$  durante 10 min. Las muestras se centrifugaron a 10 000 rpm durante 15 min y se obtuvo un precipitado que se lavó con acetona fría ( $4^{\circ}\text{C}$ ) agitándose fuertemente. Finalmente la muestra se centrifugó a 11118 g durante 5 min y el precipitado resultante se disolvió en 50  $\mu\text{l}$  de agua y se almacenó a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

### **III.2.8.2. Electroforesis en gel desnaturante de poliacrilamida**

Las muestras de proteínas se separaron mediante electroforesis unidimensional en gel desnaturante de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE). Las proteínas se desnaturaron mediante la adición de la solución tampón denaturante. La mezcla de reacción se calentó durante 5 min a 100° C para asegurar la completa denaturación de las muestras. La corrida electroforética se realizó en una cámara Mighty Small II SE 250. Se utilizó solución tampón de corrida de proteínas Tris-Glicina en los compartimentos catódico y anódico. La separación de las muestras se realizó a una corriente constante de 30 mA durante 1 h.

La visualización de las bandas se logró mediante la tinción del gel en una solución de azul de Coomassie R-250 al 0.05% durante 20 min. Posteriormente, se hicieron lavados sucesivos con solución de destinción (metanol 10% y ácido acético 10%) hasta observar las bandas de proteínas definidas.

### **III.2.8.3. Electrotransferencia de proteínas.**

La transferencia a membranas de nitrocelulosa BA-85, se realizó una vez separadas las proteínas en SDS-PAGE, en un equipo de transferencia semi-seco Trans-Blot-Turbo (BioRad, E.E.U.U.). El gel de poliacrilamida se colocó sobre la membrana y se sometió a la acción de un campo eléctrico de corriente constante (300 mA) durante 2 h en solución tampón de transferencia para Western blot.

### **III.2.8.4. Identificación de proteínas mediante *Western blot***

La inmuno-identificación de las proteínas de interés se realizó según el procedimiento descrito por Burnett en 1981. La membrana de nitrocelulosa que contuvo las proteínas

electrotransferidas se sumergió en solución de bloqueo durante 1 h, se lavó con tampón PBS y se incubó con el anticuerpo primario monoclonal anti-hEPO y/o anti-Fragmento Fc de la IgG humana a 37°C durante 1 h. Al cabo de este tiempo, la membrana se lavó a 25° C, tres veces con PBS-tween durante 5 min. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo secundario policlonal anti-ratón conjugado con HRP o NIR, diluido 1/5000, a 37° C durante 1 h y posteriormente se realizaron los mismos pasos de lavado. El revelado se realizó con un conjunto de reactivos de reacción quimioluminiscente ECL (Sigma, EE.UU.) en oscuridad, y se reveló mediante exposición en un film fotosensible. Un segundo método utilizado para revelar fue la utilización de diaminobenzidina (Sigma, EE.UU.) y peróxido de hidrogeno, revelando directamente sobre la membrana de nitrocelulosa. Los anticuerpos marcados con NIR, fueron revelados a través del equipo Odyssey(Li-Cor, EE.UU.) mediante la determinación de la absorbancia a las longitudes de onda de 680 y 790 nm.

#### **III.2.8.5. Cuantificación de EPO-Fc utilizando ELISA sándwich**

La cuantificación de la EPO-Fc presente en las diferentes muestras se realizó mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA). La EPO-Fc presente en la muestras se cuantificó mediante un sistema de ELISA-sándwich utilizando anticuerpos  $\alpha$ -hEPO, de acuerdo al protocolo validado en el Departamento de Fisiopatología, Universidad de Concepción, Chile. Se sensibilizó durante 12 h una placa de 96 pozos (Falcon, EE.UU.) utilizando un anticuerpo policlonal  $\alpha$ -EPO hecho en cabra diluido 1:2000. Posteriormente se realizaron 3 lavados para eliminar los anticuerpos no adheridos a la placa y se adicionaron diluciones de 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:5000 de la muestras de EPO-Fc purificada tanto de cultivo como de suero de leche de cabra. Se realizaron otros 3 lavados para eliminar las proteínas no retenidas. Finalmente, se adicionó el anticuerpo monoclonal detector  $\alpha$ -EPO-HRP (1:5000) y se realizaron otros 3 lavados. El ensayo se reveló con el reactivo colorimétrico O-fenilendiamina (OPD) y se midió a una densidad óptica (DO) de 492nm. Se



utilizó una muestra de hEPO comercial 55ug/mL (Recormon, Roche) para realizar la curva de calibración.

### **III.2.9. Purificación de EPO-Fc expresada en medio de cultivo de células SiHa y leche de cabra**

La purificación de la proteína EPO-Fc se realizó mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna de proteína A-Sefarosa activada con bromuro de cianógeno (Sigma, EE.UU.). Las muestras, tanto de medio de cultivo como de suero de leche de cabra, se filtraron utilizando filtros de 0.2  $\mu$ m previo a la purificación. Como primera etapa se empaquetó la columna conservando un volumen total de 5 mL de matriz. Posteriormente la columna se equilibró con tampón de Tris Base 20mM, NaCl 0.25 M, pH 8.0, utilizando 10 volúmenes a un flujo constante de 4mL/min. Las muestras se diluyeron 1:3 utilizando el mismo tampón de equilibrio y se incorporaron a la columna, colectando la “fracción no incorporada”. Posteriormente se lavó la columna con 10 volúmenes de tampón de equilibrio y se colectó una segunda fracción denominada “fracción de lavado”, y se eluyó la proteína EPO-Fc utilizando 4 volúmenes de tampón Glicina 0.1 M, NaCl 0.25M, pH 3.0. Las muestras eluidas se neutralizaron con 100uL de tampón de Tris Base 1M, pH 8.0. Todas las muestras se concentraron utilizando polietilenglicol (PEG), se dializaron contra 20 volúmenes de solución PBS, se filtraron con filtros de 0.2um y se almacenaron a -20°C.

### **III.2.10. Actividad hematopoyética *in vivo* de la EPO-Fc recombinante**

#### **III.2.10.1. Determinación de la dosis efectiva de EPO-Fc en modelos murinos**

La determinación de la dosis efectiva de EPO-Fc se realizó en modelos murinos normocíticos mediante una curva de dosis-respuesta. Para ello se utilizaron 24 grupos

experimentales de 5 ratones cada uno, de 6 semanas de edad y un peso entre de 30-40 g. Las muestras utilizadas en el ensayo correspondieron a una solución de PBS como placebo, hEPO comercial (Recormon, Roche) como control positivo, hEPO expresada en células SiHa, EPO-Fc expresada en células SiHa y EPO-Fc expresada en leche de cabra en dosis de 44, 88, 132, 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , para cada caso.

Para realizar el ensayo los ratones se anestesiaron con 2 mg de Avertín (Sigma-Aldrich, EE.UU.) por vía intraperitoneal y posteriormente cada muestra se inoculó vía intra-venosa, diluidas en PBS hasta un volumen de 100uL. La administración de las muestra se realizó en los días 1, 3 y 6 del ensayo.

Posteriormente, se colectaron muestras de sangre de los grupos de ratones el día 13 del ensayo mediante vía retro-orbital y utilizando capilares de hematocrito con heparina (Hirschmann, Alemania). Las muestras se centrifugaron a 10.000 g durante 10 min y se midió hematocrito.

### **III.2.10.2. Ensayo de actividad hematopoyética en modelos murinos.**

Se utilizaron grupos 4 grupos experimentales de 10 ratones cada uno, de 6 semanas de edad y un peso entre de 30-40g. Las muestras utilizadas en el ensayo correspondieron a una solución de PBS como placebo, hEPO comercial (Recormon, Roche) como control positivo, EPO-Fc expresada en células SiHa y EPO-Fc expresada en leche de cabra en dosis de 88 $\mu\text{g}/\text{kg}$  para cada caso. Los ratones se anestesiaron con 2 mg de Avertín (Sigma-Aldrich, EE.UU.) por vía intraperitoneal y posteriormente se inocularon vía intra-venosa con una muestra en un volumen final de 100uL. La administración de las muestra se realizaron los días 1, 3 y 6 del ensayo.

Posteriormente, se colectaron las muestras de sangre de los grupos de ratones los días 5, 7 13, 17, y 22 del ensayo mediante vía retro-orbital y utilizando en capilares de hematocrito con heparina (Hirschmann, Alemania). Las muestras se centrifugaron a

10.000 g durante 10 minutos y se determinó el incremento de hematocrito en cada uno de los casos.

### **III.2.10.3. Análisis estadístico**

Se realizó un análisis estadístico a los resultados de los ensayos de actividad biológica de las diferentes muestras de hEPO y EPO-Fc recombinantes. La normalidad de los datos se comprobó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianza se verificó mediante la prueba de Bartlett. Los datos cumplieron una distribución normal por lo que se realizó un análisis de varianza de clasificación simple y una prueba de Dunnett para la comparación de las medias de cada uno de los grupos con un control común, para un nivel de significación de  $p < 0.05$ . Se utilizó el paquete estadístico GraphPad Prism, versión 4.0.

### **III.2.10.4. Manipulación de Animales.**

La manipulación de animales se realizó de acuerdo a las normas establecidas por el comité de bioética y bioseguridad de la Universidad de Concepción y se supervisó mediante la participación personal veterinario calificado en cada una de las etapas requeridas. Agradecimientos al Departamento de Ciencias Clínicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción.

### **III.2.10.5. Desglicosilación con la enzima PNGasa F**

La proteína recombinante EPO-Fc purificada a partir de cultivo de células SiHa y leche de cabra, se desnaturalizó a 100°C durante 15 minutos en una solución que

contenía 0.1% de SDS y 5% de  $\beta$ -mercaptoetanol. Posteriormente, se adicionó Nonidet P-40 (NP-40) a una concentración final de 1%, previo a la adición de la enzima amidasa PNGasa F (Biolabs, Beverly, MA). La digestión se realizó utilizando 5 unidades de PNGasa F por  $\mu\text{g}$  de glicoproteína a una temperatura de 37° C durante 1 hora.

#### **III.2.10.6. Extracción de oligosacáridos**

Los oligosacáridos liberados mediante tratamiento enzimático con *PNGasa F* se separaron de la proteína por adición de 3 volúmenes de etanol absoluto frío. Al cabo de 30 min de incubación a -20°C, la muestra se centrifugó a 10621 g durante 10 min. El sobrenadante se colectó en un tubo de reacción y el precipitado se lavó con etanol frío al 80%. Posteriormente se centrifugó a 10621 g durante 5 min. Los sobrenadantes obtenidos de ambas centrifugaciones se combinaron y la mezcla de oligosacáridos se concentró en una centrifuga evaporadora al vacío sin calentamiento.

#### **III.2.10.7. Reacción de derivatización de oligosacáridos con 2-AB**

Los oligosacáridos secos obtenidos a partir de la desglucosilación de la proteína se marcaron con 2-aminobenzamida (2-AB) según el método de aminación reductiva descrito por Bigge y col. en 1995. A la mezcla de oligosacáridos se le añadió 5  $\mu\text{L}$  de 2-AB 0,35 M disueltos en una mezcla de dimetil sulfóxido/ácido acético (DMSO:HAc) 7:3 (vol/vol) y 5  $\mu\text{L}$  de cianoborohidruro de tetrabutilamonio 1.5 M disuelto en la misma mezcla que se refiere anteriormente. La reacción se realizó a 60°C durante 4 h. Se

añadió 200  $\mu$ L de agua destilada después de terminada la reacción y para remover el exceso de reactivo se hicieron 5 extracciones con 300  $\mu$ L de acetato de etilo.

### **III.2.11.8. HPLC en fase normal**

La mezcla de oligosacáridos unidos a 2-AB se sometió a una cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) equipado con una columna de fase normal (TSK-GEL Amida-80, 250 x 4.6 mm, Tosoh Biosep, Japón). La separación de los oligosacáridos se realizó en un equipo de separación (Shimadzu, Japón) equipado con un detector de fluorescencia. Se utilizó como solvente A una solución de ácido fórmico 50mM ajustado a pH 4.4 con una solución de amonio, y como solvente B una solución de acetonitrilo. La separación de los N-glicanos marcados, se realizó por un gradiente lineal de 20-58%(v/v) de solvente A, durante 152 minutos a un flujo de 0,4 mL/Min. Las muestras fueron cargadas en una solución de acetonitrilo al 80%(v/v). La detección de la fluorescencia se realizó utilizando una longitud de onda de excitación de 330 nm y una longitud de onda de emisión de 420nm, según el protocolo descrito por Montesino y cols, 2008. La posición de las fracciones eluidas de N-glicanos fueron determinadas en unidades de glucosa (GU) en comparación con un patrón de dextrano hidrolizado unido a 2AB, tal como es descrito por Guile y cols, 1996).

### **III.2.11.9. WAX-HPLC**

La mezcla de oligosacáridos unidos a 2-AB se separó en fracciones ácidas y neutras mediante HPLC equipado con una columna de intercambio aniónico débil (WAX-HPLC, BioSep-DEAE-PEI, 75 x 7.80 mm, Phenomenex, San Juan, Puerto Rico). Se utilizó como fase móvil un gradiente compuesto por soluciones de ácido fórmico 0.5 M (Solvente A) ajustado a pH 9.0 con una solución de amonio 37% (v/v), y metanol 10% (v/v) (Solvente B) disuelto en agua. El flujo de la separación fue de 1.0 mL/min y

la detección de fluorescencia se realizó a una longitud de onda de excitación de 339nm y una longitud de onda de emisión de 420nm, según el protocolo establecido por Guille y cols, 1994.



## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

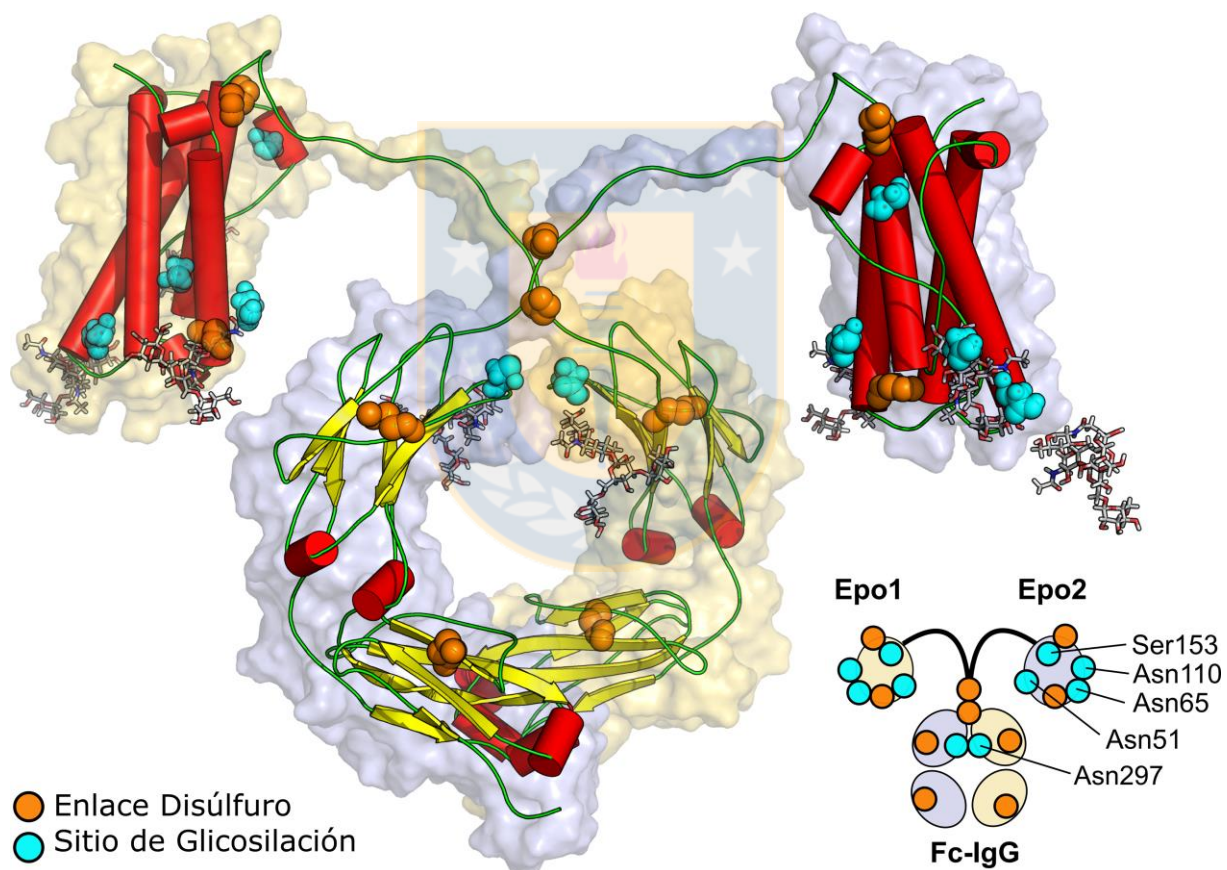
Los vectores adenovirales se presentan como una herramienta eficiente para modificar genéticamente las células de mamíferos. En el desarrollo del presente estudio se generó un vector adenoviral recombinante que codifica para la proteína de fusión EPO-Fc, unido a una señal de secreción. Este vector se usó como modelo para transducir las células epiteliales mamarias y expresar de proteínas recombinantes *in vitro* e *in vivo*. Adicionalmente, se evaluó la actividad biológica de la molécula generada y purificada a partir del suero de leche de cabras o de cultivos artificiales de células humanas.

### IV.1. Diseño de la variante dimérica de eritropoyetina EPO-Fc

La variante quimérica de hEPO se construyó fusionando un monómero de hEPO de 193 aminoácidos, con el fragmento Fc de la IgG humana de clase II de 170 residuos aminoacídicos. Para ello, se identificó en la base de datos de Genbank los cDNA correspondientes a ambas proteínas. Para preservar íntegra la funcionalidad y estructura de la proteína, se utilizó un péptido espaciador flexible compuesto a base de aminoácidos con cadenas laterales poco ramificadas, tales como Serina y Glicina, y se estableció una distancia óptima de once aminoácidos (SGGGGSGGGG). El ensamble post-traducciona l de los monómeros generó un homodímero de 748 residuos aminoacídicos, que se estabilizó mediante un enlace disulfuro que se generó a través de los residuos de cisteína presentes en el dominio CH2 de la IgG humana. El monómero quimérico, contiene cuatro potenciales sitios de N-Glicosilación localizados en los residuos de Asparagina (Asn) 24,38 y 83 ubicados en la secuencia primaria de hEPO y un último sitio en la Asparagina 297 del fragmento Fc de la IgG humana. Finalmente, la estabilidad de la molécula EPO-Fc se determinó mediante Docking y Dinámica Molecular utilizando las herramientas bioinformáticas



ProtFusión y Rosseta. Mediante los resultados obtenidos, se calculó la distancia del espaciador y el solapamiento óptimo de las subunidades, con el objetivo de prevenir la desestabilización energética de la molécula debido al impedimento estérico y la repulsión de cargas entre aminoácidos. La proteína de fusión resultante, se denominó **EPO-Fc** (Fig. 5), con una talla total estimada de 138 kDa. Finalmente, se sintetizó el gen para EPO-Fc en un vector comercial que contenía las secuencias de las endonucleasas *EcoRV* y *KpnI* para la posterior inserción del gen en el vector de interés.



**Fig. 5. Variante dimérica de hEPO.**

Diseño informático de la proteína de fusión generado mediante la herramienta ProtFusión a partir de las secuencias codificantes para hEPO y el fragmento Fc de la IgG humana clase II, utilizando un péptido enlazador flexibles de once residuos de aminoácidos (SGGGGSGGGG).

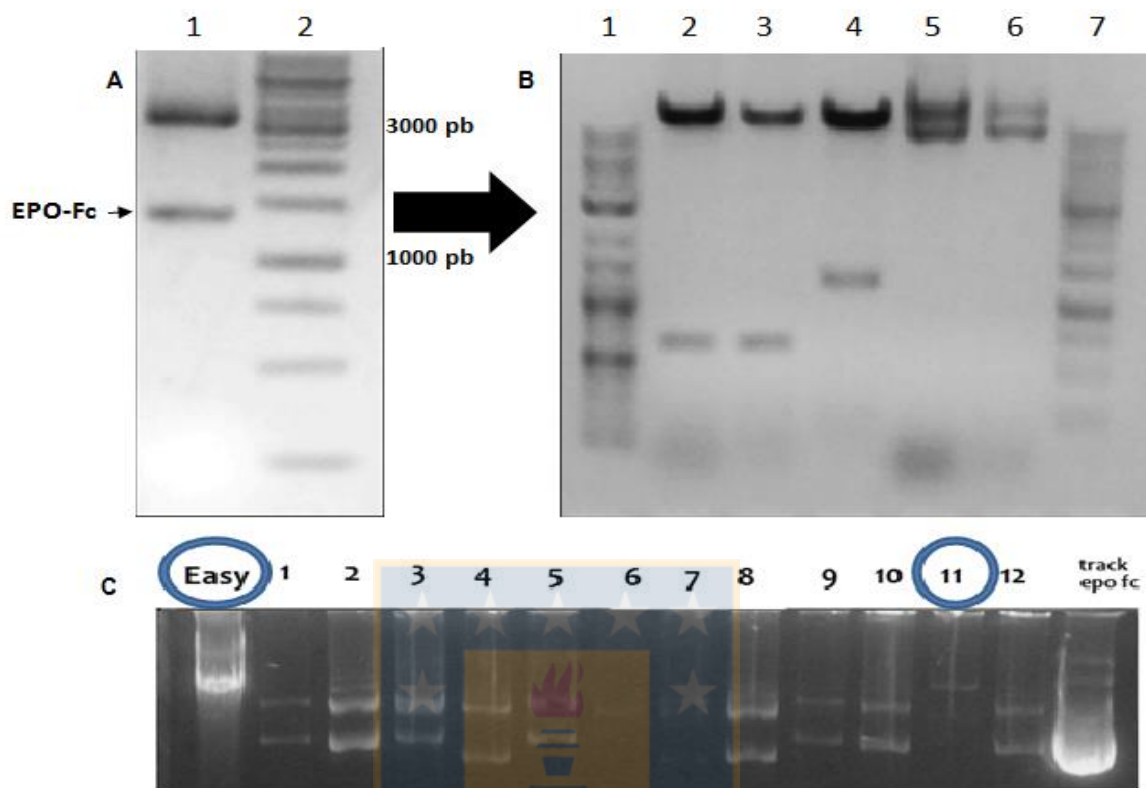


## IV.2. Generación del vector adenoviral AdEPO-Fc

El vector adenoviral AdEPO-Fc se construyó mediante el sistema de vectores AdEASY (AdEASY<sup>TM</sup>-Vector System, QuantumBiotechnologies, EE.UU). El segmento genómico de 1.3 kb correspondiente al gen de la proteína de fusión EPO-Fc (Fig. 6-A), se clonó en el vector de transferencia pAdTrack-CMV (Fig. 6-B), bajo el control del promotor inmediato temprano del citomegalovirus humano (PCMV). Como resultado de la clonación se obtuvo el plasmidio de 10.2 kb denominado pAdTrack-EPO-Fc (Fig.6-B y Fig. 7). Este vector se co-transformó con el vector pAd-EASY-1 en la cepa de *E. coli* BJ5183 y se obtuvo el plasmidio pAd-EPO-Fc (Fig.6-C), que contiene una unidad transcripcional para la proteína EPO-Fc, una segunda unidad transcripcional para el gen reportero de la proteína verde fluorescente (GFP) y el genoma del adenovirus humano serotipo 5 con las regiones E1 y E3 eliminadas ( $\Delta E1$ ,  $\Delta E3$ ).

El vector pAd-EPO-Fc se digirió con la endonucleasa *PacI* (Fig.7) con la finalidad de eliminar la región bacteriana del plasmidio y el segmento resultante de 35.77 kb se transfectó en la línea de empaquetamiento adenoviral HEK-293A (Fig.8-A), que aportan *in trans* los productos génicos de la región E1, lo que permitió la generación de viriones infectivos, denominados AdEPO-Fc. La eficiencia de la transfección y la formación de halos de lisis (Fig.8-B), así como el efecto citopático producto de la multiplicación del virus en la línea de empaquetamiento, se observó por la expresión de GFP en las células transformadas (Fig. 8 C-D).

El vector adenoviral se amplificó en la línea celular HEK-293A, en cultivos de hasta  $10^7$  células y se obtuvieron los viriones infectivos mediante lisis celular producto de pases sucesivos de congelación/descongelación y posterior centrifugación. Generando un título viral de  $10^{11}$  UFC totales de AdEPO-Fc y a partir de ese material se realizaron todos los ensayos de expresión de EPO-Fc expuestos en el presente trabajo.



**Fig. 6. Clonamiento del vector pAdTrackEPO-Fc y obtención del vector pAdEPO-Fc por vía de recombinación de homólogos.**

**A)** Obtención del gen EPO-Fc (1293 pb) a partir de un vector sintético digerido con las endonucleasas *EcoRV* y *KpnI*. **1:** Vector digerido con *EcoRV* y *KpnI*. **2:** PPM

**B)** Identificación de recombinantes positivos para pAdTrackEPO-Fc.

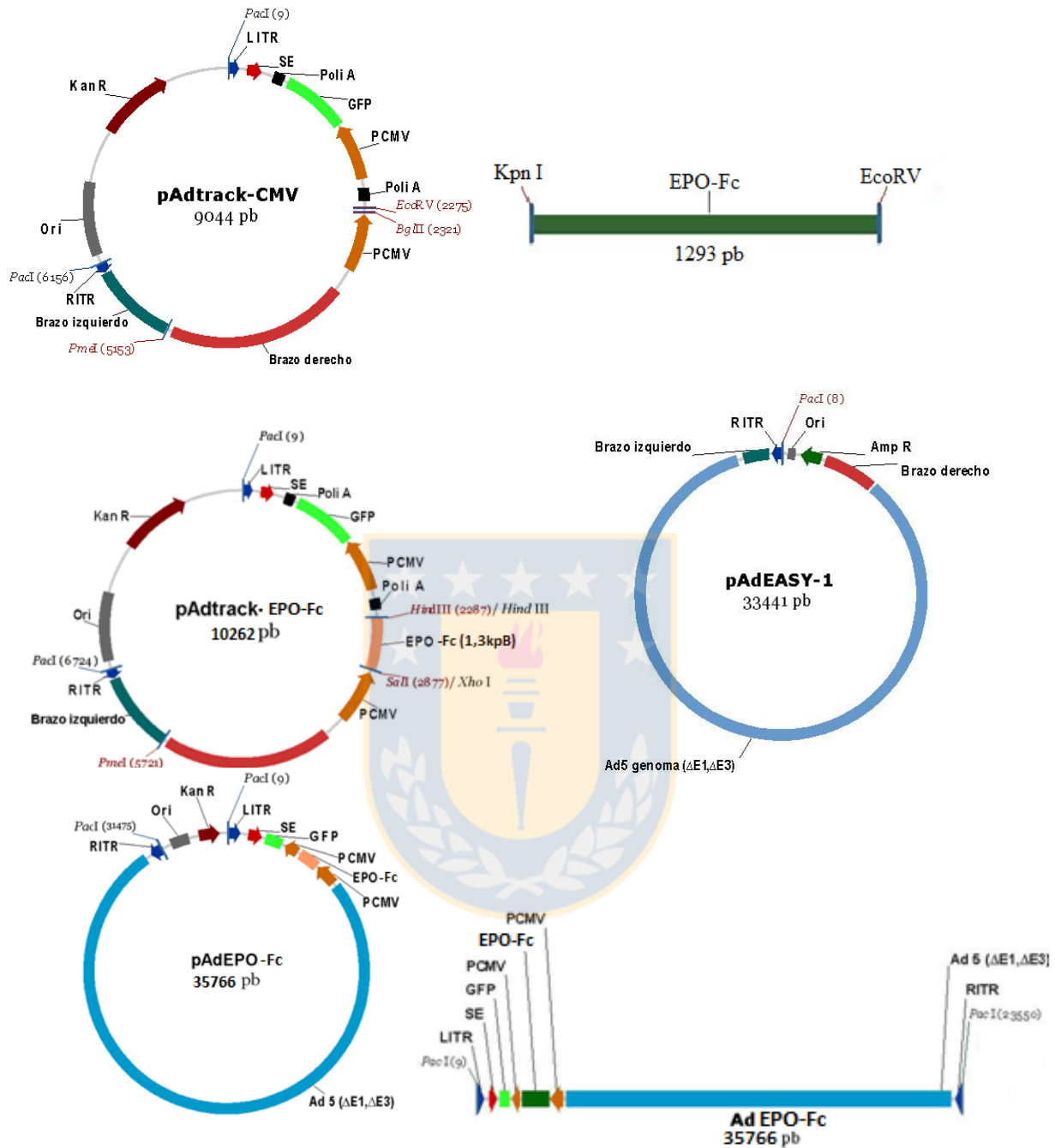
**1:** PPM **2:** recombinante positivo 1 + *KpnI* y *EcoRV*

**3:** recombinante positivo 2 + *KpnI* y *EcoRV* **4:** pAdTrack + *KpnI* y *EcoRV*

**5:** recombinante positivo 1 **6:** recombinante positivo 2

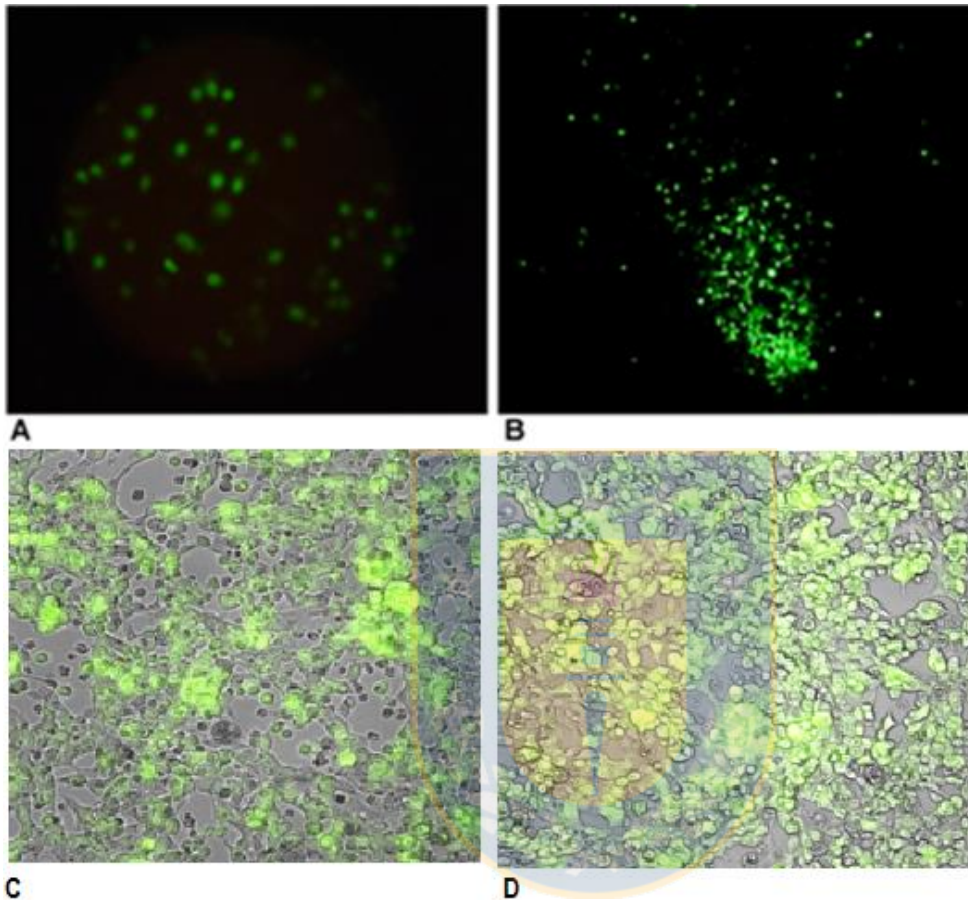
**7:** PPM 1kB

**C)** Evento de recombinación de homólogos en la cepa *E. coli BJ5183*. El vector aislado a partir de la colonia 11 presentó un patrón de migración electroforético similar al vector pAdEASY lo que lo identificó como un recombinante positivo.



**Fig. 7. Diagrama representativo de los pasos de clonación para la generación del vector adenoviral AdEPO-Fc.**

La banda correspondiente al segmento genómico de la EPO-Fc se insertó en el sitio de clonación múltiple del vector de transferencia pAdtrack-CMV y se generó el plasmidio pAdtrackEPO-Fc. Como resultado de la recombinación de homólogos entre los plasmidios pAdtrackEPO-Fc y pAdEASY-1, en la cepa de *E. coli* BJ5183, se obtuvo el vector pAdEPO-Fc. Mediante digestión enzimática con la endonucleasa *PacI*, se liberó la región bacteriana del plasmidio pAdEPO-Fc. 77



**Fig. 8. Generación y amplificación de los vectores adenovirales AdEPO-Fc en la línea de empaquetamiento HEK-293A.**

**A:** Transfección del genoma adenoviral recombinante del AdEPO-Fc en la línea celular HEK-293A. Microfotografía en campo oscuro con magnificación de 100 X.

**B:** Formación de halos de ruptura celular como resultado de la multiplicación del adenovirus recombinante. Microfotografía en campo oscuro con magnificación de 40 X.

**C:** Amplificación del vector AdEPO-Fc 24 h post-infección. Microfotografía en campo claro con magnificación de 40 X.

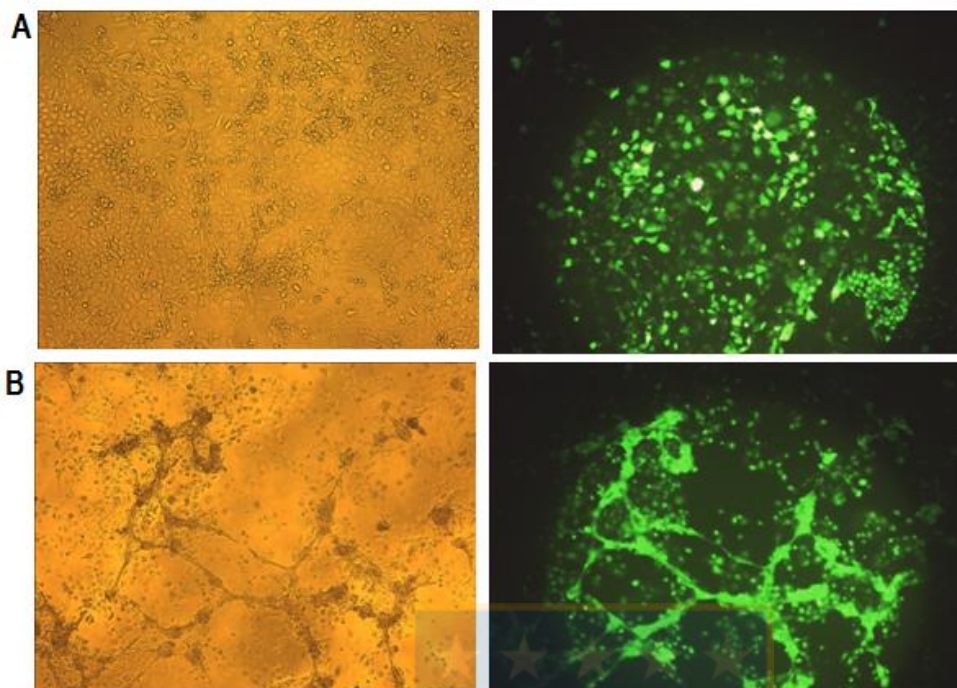
**D:** Amplificación del vector AdEPO-Fc 48 h post-infección. Microfotografía en campo claro, magnificación de 40 X.

### IV.3. Ensayo de transducción adenoviral en cultivos de GMEC.

Para evaluar la capacidad del vector adenoviral AdEPO-Fc de transducir células epiteliales mamarias, se realizó un ensayo de transducción en cultivos *in vitro*. Se seleccionó como modelo, el cultivo primario **GMEC**, que correspondía a un cultivo enriquecido en células epiteliales de glándula mamaria de cabra. El cultivo celular anteriormente descrito, se utilizó como modelo *in vitro* para homologar el microambiente de la glándula mamaria. La cantidad óptima de partículas virales por célula se estandarizó previamente, transduciendo células GMEC con títulos de multiplicidad de infección (MOI) de 14, 25, 70, 210 y 400 UFC/célula. 24 h post-transducción se detectó la expresión del gen reportero GFP como parámetro comparativo, observando una expresión máxima a 25 UFC/célula (Fig.9-A) para la línea control humana SiHa en contraste del cultivo de células GMEC (Fig.9-B) que presentó una expresión máxima del gen reportero GFP utilizando 70 UFC/célula. Además, el cultivo primario de glándula mamaria de cabra presentó la particularidad de formar estructuras ramificadas por sobre la monocapa que fueron denominados “domos celulares” (Fig.9-B), con una estructura semejante a los acinos glandulares reportados en la glándula mamaria *in vivo*.

La elevada capacidad de transducción adenoviral mostrada por las células GMEC durante el ensayo pudiera relacionarse con una expresión abundante del receptor de coxsackievirus y adenovirus (CAR) en las células epiteliales mamarias (Qin y col., 2003). En base a esta evidencia, se debía ocurrir un fenómeno similar en las células epiteliales de la glándula mamaria de cabra *in vivo*.





**Fig. 9. Transducción adenoviral de cultivos de células humanas y murinas.**

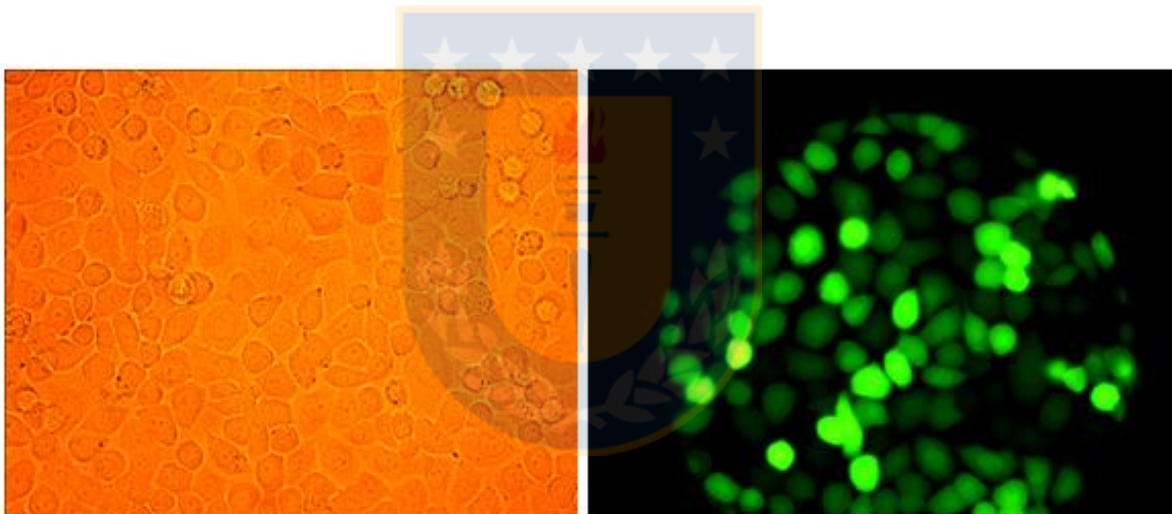
**A:** Transducción de células SiHa con 70 UFC/cel, como un modelo comparativo de línea CHO en la que se produce actualmente hrEPO a nivel industrial. Microfotografía en campo claro y campo oscuro con magnificación de 40 X

**B:** Transducción de células GMEC con 70 UFC/cel, como un modelo *in vitro* de la transducción de células epiteliales mamarias. Microfotografía en campo claro y campo oscuro con magnificación de 40 X.

#### IV.4. Expresión de la proteína de fusión EPO-Fc en células SiHa.

Como control positivo para validar los experimentos posteriores se expresó la proteína EPO-Fc en un sistema basado en cultivo de células SiHa como un modelo celular humano (Fig.10). La cantidad óptima de partículas virales por célula para transducir las células SiHa, se determinó previamente mediante un ensayo de transducción con una MOI de 5, 14, 25, 70 y 210. Se tomó como criterio de transducción la expresión de GFP en las células transformadas. A las 24 h post-transducción se detectó la expresión de GFP en el 100% de los cultivos, que fue especialmente intensa en las

células tratadas con la MOI de 25, según la evaluación cuantitativa del color verde en los cultivos. Para comprobar la presencia de la proteína EPO-Fc en el medio de cultivo y la fracción retenida intracelularmente se precipitaron y concentraron las proteínas obtenidas en ambos extractos y se realizó una electroforesis de proteínas con su respectivo *Western blot* (Fig. 11). El análisis en SDS-PAGE mostró la presencia de la proteína EPO-Fc en el medio de cultivo entre 100 y 150 kDa, lo que se corresponde con el peso molecular estimado para el dímero de EPO-Fc, correspondiente a 130 kDa en condiciones desnaturalantes no reductoras (Fig.11-B). Del mismo modo, cuando se realizó el SDS-PAGE en presencia de un agente reductor, se apreció una banda entre 50 y 60 kDa que se coincide con el tamaño esperado de 60 kDa para el monómero proteico (Fig.11-A).

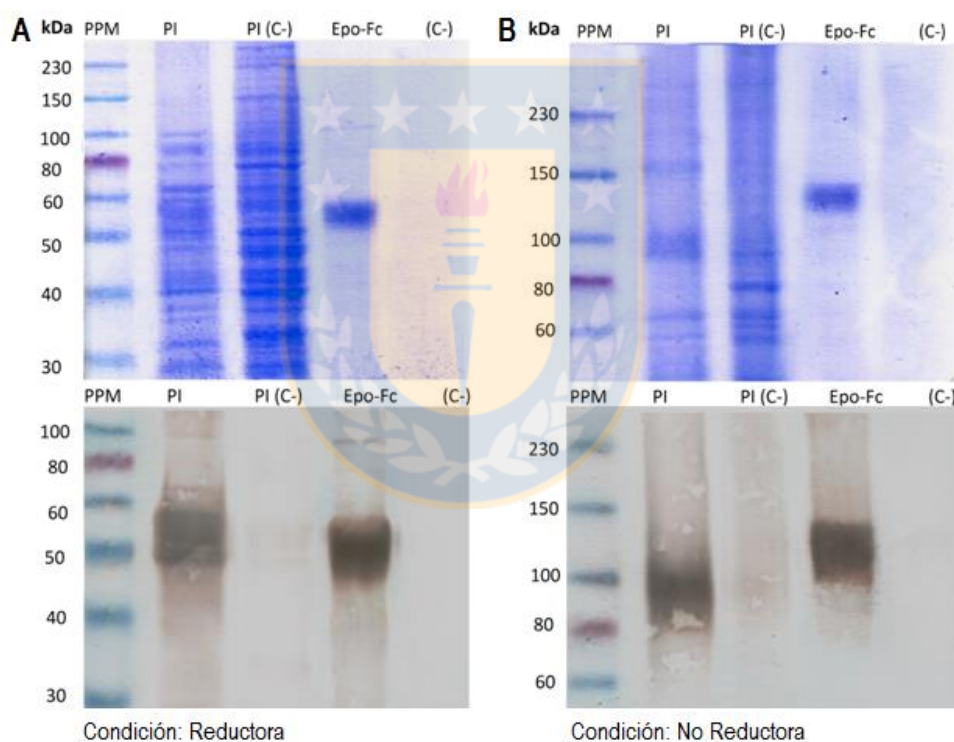


**Fig. 10. Expresión de la proteína EPO-Fc y GFP a las 96 h post-transducción adenoviral en células SiHa.**

*Microfotografía en campo claro y campo oscuro con magnificación de 100 X.*

El *Western blot* realizado tanto en condiciones reductoras como no reductoras, indica la presencia de EPO-Fc con un patrón de banda ancho, característico de proteínas multi-glicosiladas, del mismo modo se visualiza una banda intensa en la fracción intracelular (PI) de la proteína, la que presenta un peso molecular menor que la

fracción secretada (Fig.11-B). Esta proteína podría corresponder a la fracción de EPO-Fc retenida intracelularmente que aun no ha sido modificada por la adición de glicanos a nivel del Golgi. Adicionalmente, el análisis en SDS-PAGE y Western Blot mostró una banda única en condiciones no reductoras, lo que indicó una elevada estabilidad de la proteína de fusión producto de los enlaces disulfuro intracatenarios presentes en la región CH2 de la secuencia primaria correspondiente a la IgG humana. Las bandas fueron identificadas mediante Western blot con el anticuerpo monoclonal  $\alpha$ hEPO (Fig. 11). Finalmente las cantidades de proteína EPO-Fc aisladas de medio de cultivo se cuantificaron mediante ELISA, y se obtuvo una concentración para EPO-Fc de 100 ug/mL.



**Fig. 11. Análisis en SDS-PAGE 10%, tinción con azul de Coomassie y Western blot con anticuerpo monoclonal  $\alpha$ hEPO.** Se evaluó en cada caso la cantidad de proteína EPO-Fc secretada al medio de cultivo (EPO-Fc) y la fracción retenida intracelularmente (PI), con sus respectivos controles (C-) y PI (C-).

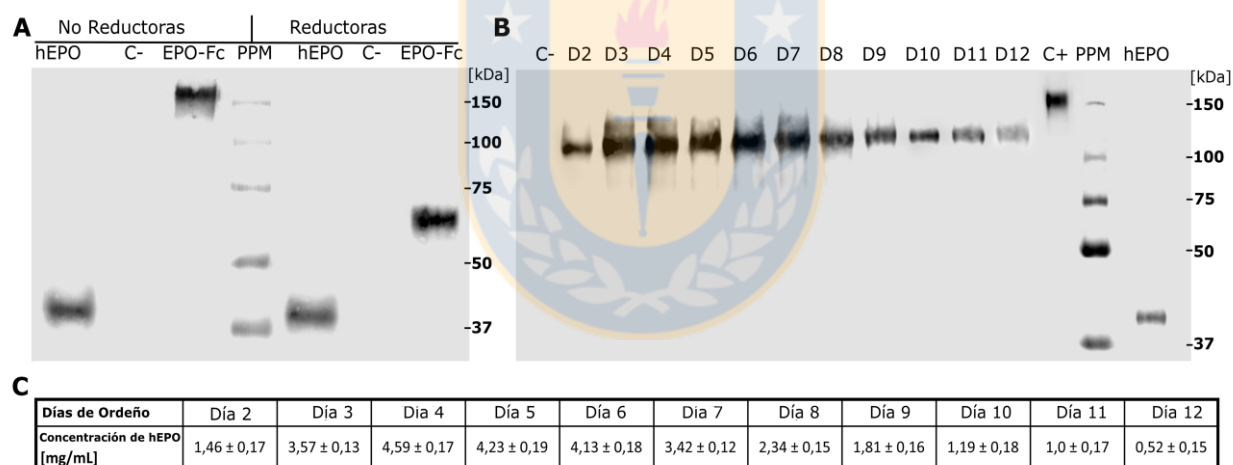
**A)** Caracterización de la proteína EPO-Fc en presencia de un agente reductor, capaz de romper los puentes di-sulfuros presentes en la región Fc de la IgG humana.

**B)** Visualización de la proteína EPO-Fc en condiciones no reductoras.



#### IV.5. Transducción de la glándula mamaria de cabra con el vector AdEPO-Fc

Los resultados obtenidos anteriormente permitieron estandarizar los parámetros a tener en cuenta para lograr niveles elevados de expresión de proteínas recombinantes en la glándula mamaria. Mediante un protocolo previamente establecido (Toledo y cols., 2006), se realizó la transducción adenoviral con el vector AdEPO-Fc en la glándula mamaria de cabras durante la lactación inducida hormonalmente, en presencia de EGTA 36mM. El fundamento del uso de EGTA se debe a que durante la lactación activa se produce una impermeabilización del epitelio secretor, reforzada por la formación de uniones estrechas entre las células epiteliales polarizadas (Nguyen y col. 2001). Esto conduce a una menor accesibilidad a los receptores adenovirales desde la superficie apical, debido a que estos parecen encontrarse en la cara basolateral del epitelio mamario.



**Fig. 12: Cinética de expresión de EPO-Fc en leche de cabras transducidas con el AdEpo-Fc.**

**A)** Western blot ( $\alpha$ hEPO) en condiciones No reductoras y reductoras, de las muestras de EPO-Fc expresadas en cultivos de células SiHa y un control comercial de hEPO (Recormon).

**B)** Western blot en condiciones no reductoras, de las muestras de suero de leche obtenidas a partir de la glándula mamaria de cabras transducidas con el vector adenoviral AdEPO-Fc. **PPM:** patrón de peso molecular; **D2-D12:** Suero de días post-transducción; **C+:** Epo-Fc expresada en cultivo de células SiHa; **hEPO:** control de eritropoyetina humana.

**C)** Niveles de expresión de la proteína EPO-Fc presente en la leche de cabras transducidas adenoviralmente y determinados mediante ELISA.

Una ruptura temporal de estas uniones estrechas, mediada por el ácido etilen-glicol-tetracético EGTA (Stelwagen y col., 1995), incrementa el acceso de los vectores adenovirales a sus receptores celulares desde la superficie apical de las células epiteliales. En base a lo anteriormente descrito, las glándulas mamarias de una cabra nulípara con lactación inducida hormonalmente, se lavaron con un tampón EGTA 36mM y se infundieron con el vector AdEPO-Fc a una concentración de  $10^9$  UFC/mL de modo similar al proceso previamente validado en modelos murinos. El ensayo se comenzó en el día 13 del protocolo de inducción hormonal (Cammuso y col., 2000). En esta etapa la glándula ya había completado su proceso de crecimiento por el efecto del tratamiento con esteroides (progesterona/estradiol) y presentó una secreción estable de leche. Cabe destacar que el flujo de leche en los 3 días posteriores se incrementó por el efecto relajante de terapia con prednisolona.

La cinética de expresión de la EPO-Fc en el suero de leche de las cabras, se visualizó mediante un análisis en SDS-PAGE al 10% y la proteína se identificó realizando un *Western blot* utilizando un anticuerpo monoclonal  $\alpha$ hEPO, en donde se observó una banda única correspondiente a la proteína de interés, lo que confirmó que EPO-Fc se expresa correctamente en este sistema de expresión (Fig. 12-B). La proteína EPO-Fc que se obtuvo en la leche de cabra presentó un tamaño molecular de 130 kDa aproximadamente, inferior a su homóloga expresada en cultivos celulares. La disminución en la talla molecular, comparada con la proteína EPO-Fc expresada en cultivo de células SiHa, podría deberse a una diferencia en el patrón de glicosilación de la EPO-Fc expresada en la glándula mamaria de cabra.

El promedio de expresión de la EPO-Fc se determinó mediante ELISA y se obtuvo valores promedios de 3 g/L en los primeros 7 días de ordeño (Fig. 12-C), con una marcada disminución de la expresión hacia el día 8 hasta el día 12. Los resultados concuerdan con lo descrito por otros autores, que identifican un corto tiempo para la expresión de transgenes mediada por vectores adenovirales de primera generación

( $\Delta E1$ ,  $\Delta E3$ ), (Liu y cols, 2010; Yang y col., 1994; Lusky y col., 1998). Esto pudo deberse a la respuesta inmune del hospedante contra las proteínas adenovirales que se expresan en las células transformadas (Hun y cols, 2010; Yang y col., 1996; Ghazizadeh y col., 2003).

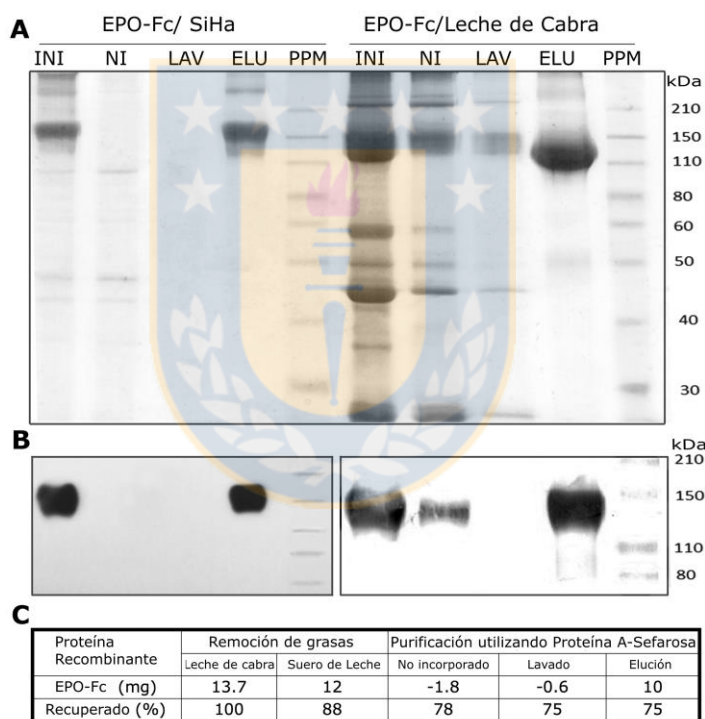
#### **IV.6. Purificación de la proteína de fusión EPO-Fc expresada *in vitro* e *in vivo***

Para concentrar la proteína de interés y eliminar la presencia de moléculas interferentes que puedan influir en el posterior análisis de actividad biológica, se realizó la purificación de la proteína de fusión expresada. Tomando ventaja del diseño particular generado para la variante quimérica EPO-Fc, se realizó la purificación de las isoformas de EPO-Fc expresadas tanto en cultivos de células SiHa (análogo del sistema productivo actual en células CHO), como en la leche de cabra, mediante una cromatografía de afinidad utilizando una matriz de proteína A-Sefarosa activada con bromuro de cianógeno. El fundamento de la técnica se basa en el uso de la proteína A de *Staphylococcus aureus* que interactúa y se une al fragmento Fc de diversas IgG humanas (Freydell y cols., 2010).

Para la purificación de EPO-Fc expresada *in vivo* y obtenida a partir de la leche de cabra, se mezclaron las muestras de leche colectadas en los días 4, 5 y 6 de ordeño que corresponden a los días de mayor expresión (~4 g/L de EPO-Fc), ambas muestras, fueron purificadas por separado mediante recirculación sucesiva por la columna de afinidad y posterior elución mediada por cambio de pH.

El análisis en SDS-PAGE al 10%, (Fig. 13-A) reveló una banda cercana a los 130 kDa en cada una de las fracciones, que coincide con el tamaño de la proteína EPO-Fc, que está presente desde la porción inicial hasta el eluido, siendo esta última fracción la más enriquecida en el proceso de purificación. Para confirmar que la banda obtenida pertenecía a EPO-Fc se realizó un *Western blot* utilizando un anticuerpo

monoclonal  $\alpha$ hEPO (Fig.13-B). Los resultados obtenidos sugieren que la cromatografía de afinidad resultó ser eficiente y específica para la unión de la proteína de fusión, no detectándose proteína en la fracción de lavado de la columna. Mediante rondas sucesivas de purificación se determinó que la captación máxima de la matriz de proteína A-Sefarosa correspondía a 5 mg de EPO-Fc/mL de matriz con un 95% pureza y un porcentaje de recuperación del 75% respecto a la muestra inicial (Fig.13-C). De esta forma, se logró purificar la proteína EPO-Fc en un solo paso cromatográfico, en contraste a las cinco etapas cromatográficas a la que debe ser sometida la rhEPO en el sistema de producción basado en cultivos celulares (Chu y cols., 2001; Dehnes, 2010; Lönnberg, 2010).



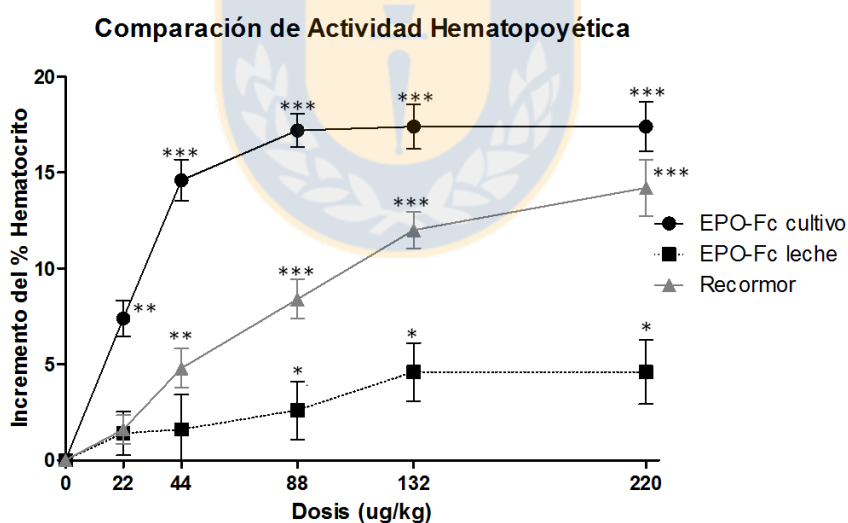
**Fig. 13. Purificación de EPO-Fc a partir de células SiHa y de leche de cabra.**

**A)** Análisis en SDS-PAGE 10% con tinción azul de Coomassie. **PPM:** Patrón de peso molecular de proteínas preteñido; **INI:** Fracción inicial; **NI:** Fracción no incorporada a la matriz; **LAV:** Fracción de lavado; **ELU:** Eluido correspondiente a EPO-Fc purificado.

**B)** Western Blot ( $\alpha$ hEPO) en condiciones No reductoras de las fracciones colectadas en el proceso de purificación.

#### IV.7. Actividad hematopoyética *in vivo* de la proteína EPO-Fc expresada en leche de cabra

La actividad biológica de la proteína EPO-Fc, expresada en las células SiHa y en la glándula mamaria de cabras, se determinó mediante un modelo hematopoyético *in vivo*, utilizando modelos murinos de la línea C57-BL6. Las muestras de EPO-Fc expresadas en células SiHa y en la glándula mamaria de cabra, fueron purificadas mediante cromatografía de afinidad y posteriormente se concentraron y dializaron contra un tampón PBS. La concentración de la proteína en ambos casos se determinó mediante ELISA utilizando un anticuerpo  $\alpha$ hEPO y extrapolando los valores a partir de una curva de calibración que se realizó con un patrón de rhEPO comercial (Recormon®, Roche), de concentración conocida. Los valores de concentración obtenidos fueron de 0,6 mg/mL y 2mg/mL de EPO-Fc purificados a partir de células SiHa y leche de cabra, respectivamente.



**Fig. 14: Curva dosis-respuesta para EPO-Fc.**

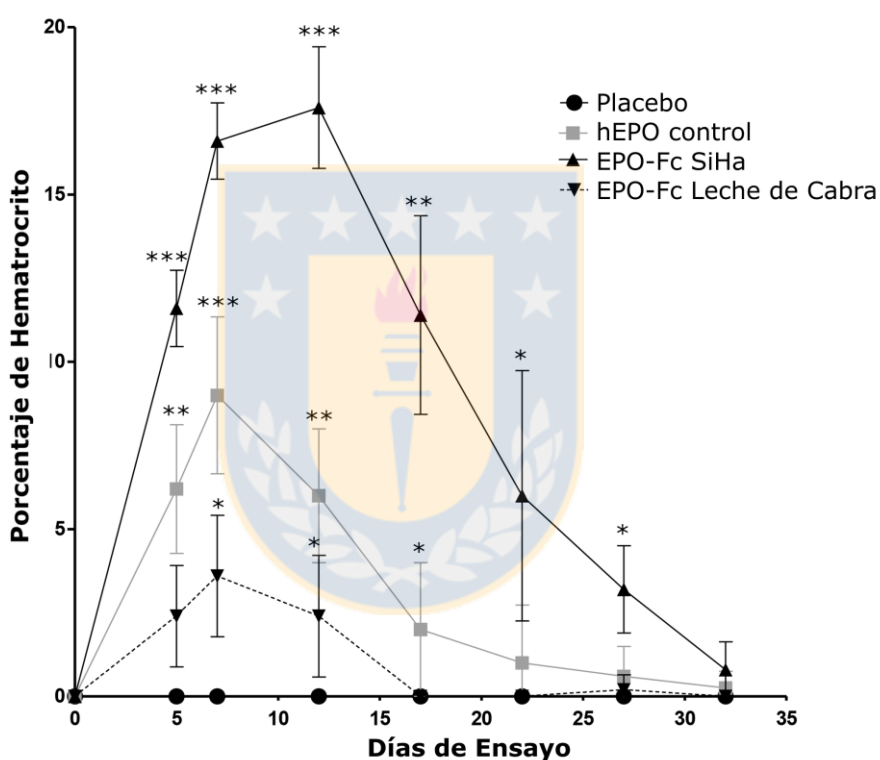
La actividad biológica se determinó como el incremento del hematocrito en ratones B6D2F1 normocíticos, inoculados con tres dosis de las muestras de hEPO y EPO-Fc recombinantes. Los puntos de las líneas de tendencia representan el promedio y la desviación estándar del respectivo grupo experimental.

Para determinar la mínima dosis de proteína recombinante a la cual se obtuvo el máximo incremento del hematocrito en modelos murinos, se realizó una curva de dosis-respuesta. Para ello, se inocularon cuatro grupos experimentales, con dosis de 44, 88, 132, 176 y 220 ug/kg de peso de la proteína EPO-Fc expresada en cultivo y en la glándula mamaria de cabras (Fig. 14). Además, se establecieron como controles un placebo en base a PBS y la curva dosis respuesta de una rhEPO comercial (Recormor®, Roche). A partir de la curva dosis-respuesta (Fig.14) se determinó que la dosis óptima en modelos murinos normocitémicos correspondía a 88 ug/kg de peso, a la que se alcanzó un máximo de incremento de hematocrito correspondiente al 15% para EPO-Fc expresado en cultivo de células SiHa.

Los valores presentados en la gráfica se normalizaron con respecto a los valores de hematocrito obtenidos en el grupo control y se expresaron como el incremento en el porcentaje de hematocrito. Determinada la dosis efectiva, se realizó un ensayo comparativo de actividad hematopoyética en el tiempo, en el cual se seleccionaron 4 grupos experimentales, a los cuales se les administraron 3 dosis de 88 ug/kg de las respectivas muestras en un período de 6 días. Se colectaron muestras de sangre los días 1, 5, 7, 13, 17, 23,27 y 33 del ensayo y se obtuvieron los parámetros de actividad biológica correspondientes, los que se normalizaron respecto al grupo control.

Los resultados obtenidos indican que tanto el control positivo de rhEPO como la proteína EPO-Fc expresada en cultivo indujeron un incremento estadísticamente significativo en el hematocrito con respecto al grupo placebo (prueba de Dunnett,  $p < 0.05$ ). La media del grupo EPO-Fc de cultivo resultó ser aproximadamente 3 veces superior al valor observado en los animales tratados con la rhEPO (Recormon®)(Fig.15). La medición de hematocrito en diversos días del ensayo, permitió de igual modo evaluar la biodisponibilidad de la molécula EPO-Fc de cultivo, en donde se observó un aumento significativo en la vida media de la molécula en

sangre, prolongando su actividad aproximadamente en 10 días más que el control de rhEPO comercial (Fig.15). Este resultado sugiere que al aumentar la talla de la molécula mediante la generación de una proteína de fusión, fue posible incrementar la biodisponibilidad del biofármaco producto de una disminución en la depuración renal. Sin embargo, contrario a lo esperado, la actividad hematopoyética de la EPO-Fc expresada en leche de cabra no evidenció un incremento significativo con respecto al grupo control negativo (Fig.15).



**Fig. 15. Actividad hematopoyética *in vivo* de la EPO-Fc expresada en células SiHa y en la glándula mamaria de cabra.**

**A)** Cinética de actividad hematopoyética para EPO-Fc, determinada a partir del incremento del hematocrito en modelos murinos normocíticos inoculados con 3 dosis de hrEPO o EPO-Fc. Los puntos de las líneas de tendencia representan el promedio y la desviación estándar dentro del grupo experimental. El análisis estadísticos de los datos se realizó respecto al grupo placebo, mediante la prueba de Dunnett y un ensayo One-Way ANOVA( $p < 0.05$ ).

#### **IV.8. Análisis del perfil de oligosacáridos N-enlazados a EPO-Fc.**

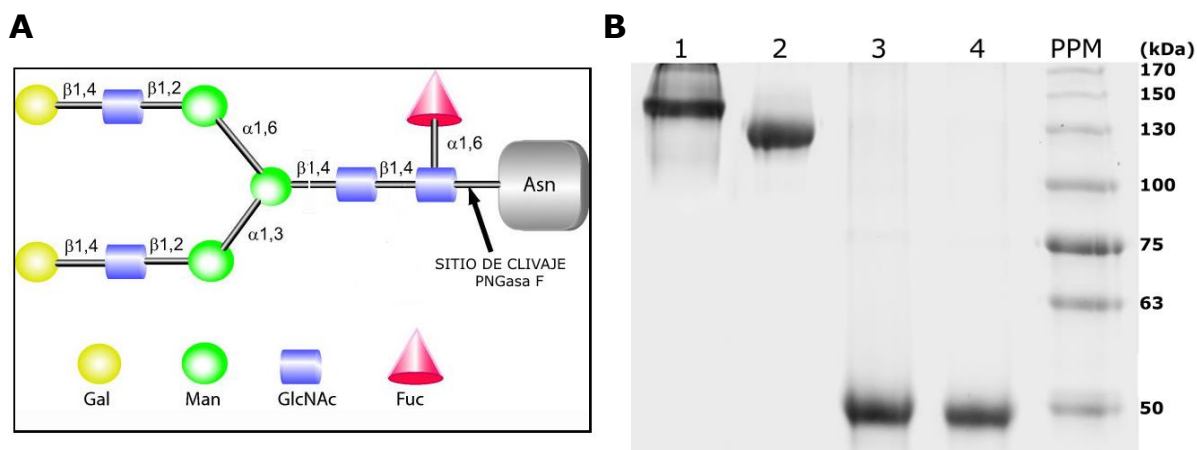
La proteína EPO-Fc posee un peso molecular aproximado de 138 kDa, cuyo contenido de oligosacáridos constituye el 30% del peso la molécula, por lo que una variación en el patrón de glicosilación puede modificar significativamente el peso molecular de la glicoproteína.

Con el objetivo de evaluar si la actividad hematopoyética reducida de la variante EPO-Fc expresada en leche de cabra se debía a la alteración en el patrón de glicosilación, se realizó el análisis de los glicanos presentes en las variantes recombinantes de cultivo y leche.

En consecuencia, para determinar si la diferencia en el peso molecular de las variantes de EPO-Fc de cultivo y leche, correspondía a una diferencia en la secuencia aminoacídica o al grado de polimerización de los oligosacáridos N-enlazados (Fig. 12-B), se desarrolló un ensayo de N-desglicosilación con *PNGasa F*, que hidroliza el enlace entre el residuo de asparagina y el primer residuo de N-Acetil Glucosamina (Fig.16-A).

Posterior al tratamiento con la endoglicosidasa, el análisis en SDS-PAGE 10% mostró que los monómeros resultantes presentaron en ambos casos una talla idéntica y aproximada de 50kDa (Fig.16-B, carriles 3 y 4). El resultado confirmó que la diferencia en el tamaño de ambas isoformas se atribuye a las estructuras N-enlazadas a la molécula quimérica, en los residuos de asparagina 24, 38 y 83 presentes en la secuencia primaria de hEPO y al residuo de asparagina 297 presente en el fragmento Fc de la IgG I humana.





**Fig. 16. Ensayo de N-desglicosilación de EPO-Fc con PNGasa F**

**A)** Esquema del sitio de corte para *PNGasa F*.

**B)** Análisis SDS-PAGE 10% en condiciones no desnaturalantes de las variantes de EPO-Fc de cultivo y leche. **1:** EPO-Fc expresada en cultivo celular; **2:** EPO-Fc expresada en leche de cabra ; **3:** EPO-Fc expresada en cultivo celular tratado con *PNGasa F* en condiciones desnaturalantes ; **4:** EPO-Fc expresada en leche de cabra en condiciones desnaturalantes ; **5:** Marcador de peso molecular.

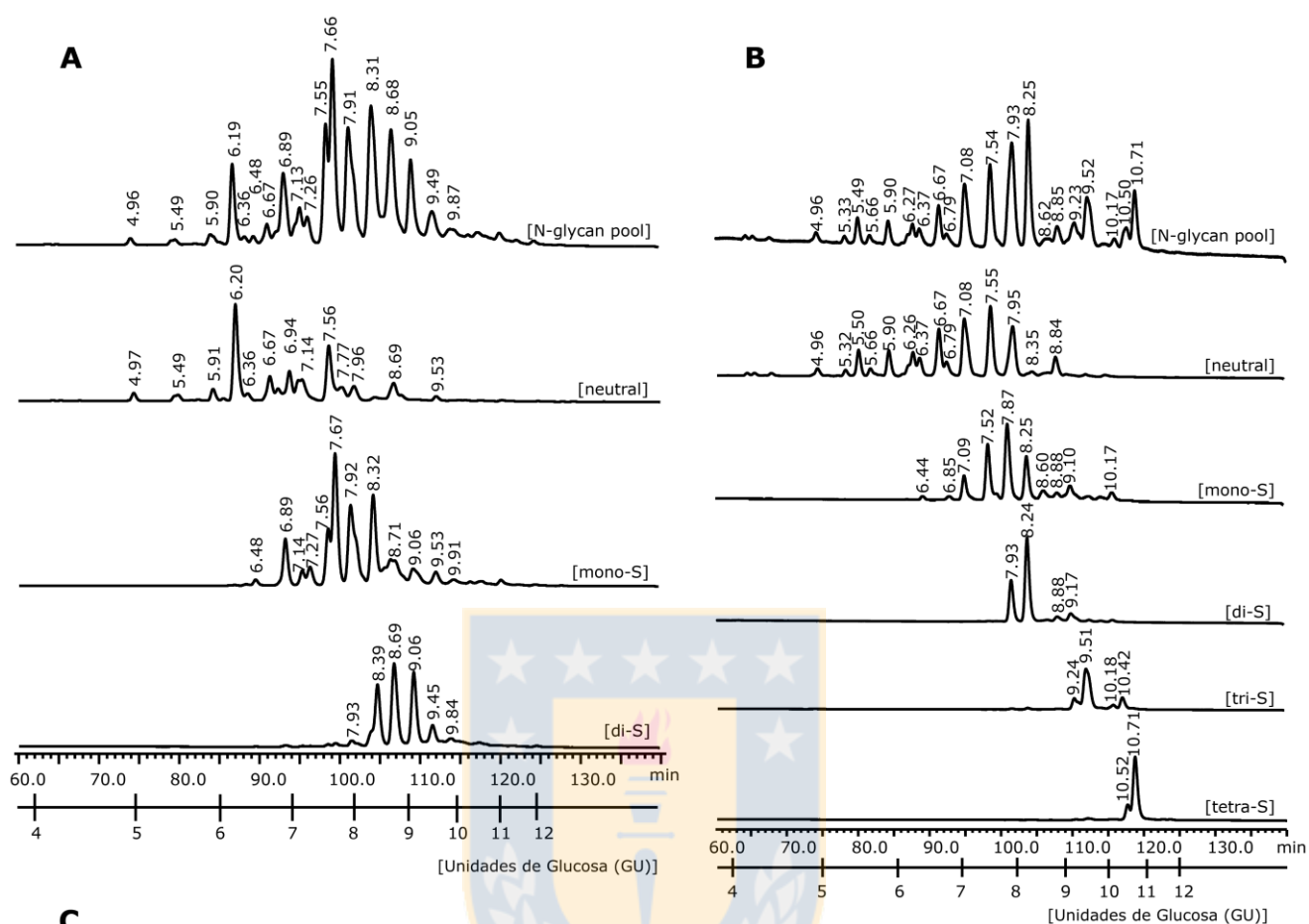
#### IV.9. Perfil de isoformas de los oligosacáridos N-enlazados a la EPO-Fc.

Después de obtener la fracción que contiene los oligosacáridos de la cadena proteica por digestión enzimática con *PNGasa F*, los glicanos libres fueron marcados con el fluoróforo 2-aminobenzamida (2AB), mediante una reacción de aminación reductiva, en la que se obtuvieron derivados completamente estables. La mezcla de glicanos cargados se separó mediante cromatografía de intercambio aniónico débil (WAX-HPLC), y un gradiente de Fomiato de amonio-Acetonitrilo y Metanol.

Las muestras se separaron en función del contenido de Ac. acetil-N-neuramínico terminal (Ac. Siálico) presente en los glicanos aislados, obteniéndose fracciones neutras carentes de Ac. Siálico y fracciones mono, di, tri y tetra cargadas.

Posteriormente, se evaluó el perfil de separación de cada una de las fracciones aisladas a partir de los oligosacáridos N-enlazados a las EPO-Fc recombinantes, expresadas en células epiteliales mamarias de cabra y en cultivo de células SiHa, mediante cromatografía en fase normal (HPLC) utilizando una matriz Amida 80 y un gradiente de Amonio-Acetonitrilo. De esta forma, en la separación cromatográfica el tiempo de elución se correlaciona directamente con el tamaño del oligosacárido correspondiente.

Los resultados obtenidos indican que el perfil de los N-glicanos enlazados a la EPO-Fc expresada en leche de cabra, resultó diferir en gran medida respecto de su homóloga expresada en cultivos celulares. Los picos mayoritarios presentes en la EPO-Fc expresada en leche de cabra mostraron un desplazamiento hacia bajos tiempos de elución, lo que se corresponde con estructuras oligosacáridicas mono y di-antenarias (Fig.17-A). Mientras que su variante de cultivo, presentó picos relacionados con estructuras tri y tetra-antenarias (Fig.17-B). Revelando una abundancia cercana al 34% de glicanos tri y tetra-cargados unidos a la EPO-Fc expresada en cultivos celulares. Sin embargo, para la variante de EPO-Fc expresada en la leche de cabra, solo se reveló la presencia de estructuras mono y di-sialiladas (Fig. 17-C).



EPO-Fc	Porcentaje de N-Glicanos a partir de fraccionamiento WAX-HPLC (%)				
	Neutral	Mono-S	Di-S	Tri-S	Tetra-S
Desde Leche de Cabra	25	57	17	nd	nd
Desde Células SiHa	45	11	10	17	17

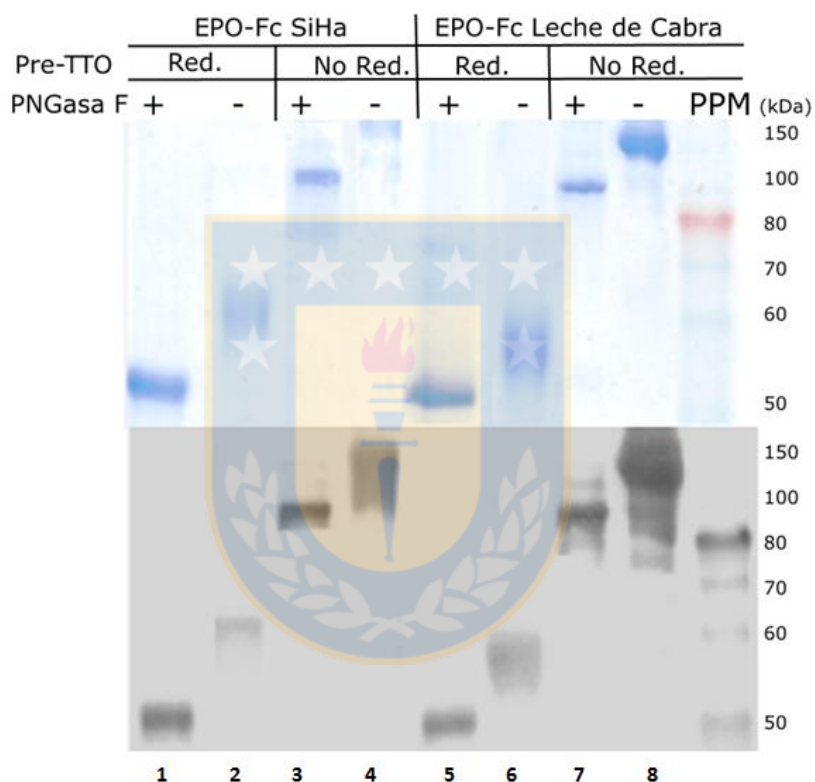
**Fig. 17 Perfil de glicanos N-enlazados de EPO-Fc recombinante expresada en células SiHa y leche de cabra.**

Los oligosacáridos marcados con 2AB fueron fraccionados mediante cromatografía de intercambio aniónico débil (WAX-HPLC) y posteriormente separados por HPLC en fase normal.

- A)** Perfil de glicanos de EPO-Fc expresada en cultivos artificiales de células SiHa.
- B)** Perfil de glicanos de EPO-Fc expresada en la glándula mamaria de cabras.
- C)** Porcentaje de glicanos obtenidos a partir de WAX-HPLC.

#### IV.10. Análisis de actividad hematopoyética de variantes deglicosidadas de EPO-Fc.

Para determinar la correlación del perfil glicosídico presente en la EPO-Fc y su actividad hematopoyética *in vivo*, se realizó un segundo ensayo en modelos murinos normocíticos. Previo al ensayo, se evaluó la capacidad de la amidasa PNGasa F para deglicosilar la proteína EPO-Fc en condiciones no denaturantes, con el fin de mantener intacta la estructura de la proteína.



**Fig. 18. Ensayo de N-desglicosilación de EPO-Fc con *PNGasa F* en condiciones reductoras y no reductoras.**

*Análisis en SDS-PAGE 10% con tinción azul de Comassie y Western Blot con anticuerpo monoclonal  $\alpha$ hEPO.*

**PPM:** Patrón de peso molecular de proteínas preteñido;

**Pre-Tratamiento Reductor:** SDS+DTT

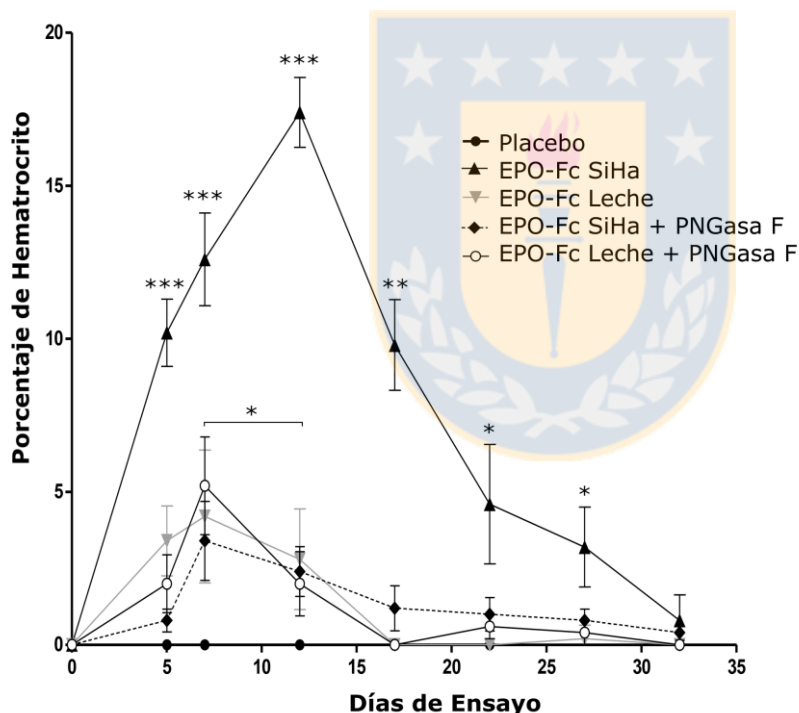
**Pre-Tratamiento no Reductor:** PBS

El análisis en SDS-PAGE al 10% en condiciones no denaturantes mostró una banda cercana a 100 kDa para las variantes de cultivo y leche tratadas con PNGasa F (Fig. 18, carriles 4 y 8), mientras que el control de EPO-Fc expresado en cultivo presentó un peso molecular ligeramente superior al de su homólogo en leche. Además, se observó el mismo patrón cuando las muestras fueron denaturadas previo al tratamiento con PNGasa F, observándose una banda común cercana a 50 kDa (Fig. 18, carriles 1 y 5), que confirmó la actividad de la enzima en una muestra denaturada y en condiciones nativas de EPO-Fc. Es así como, el ensayo de desglicosilación mostró que la digestión con PNGasa F fue capaz de desglicosilar completamente las isoformas EPO-Fc de cultivo y leche en condiciones no denaturantes (Fig.18), sin embargo, fue necesario utilizar una cantidad de enzima 5 veces mayor a la requerida en presencia del pre-tratamiento reductor.

Determinadas las condiciones para desglicosilar la proteína EPO-Fc en condiciones no denaturantes, se realizó un ensayo hematopoyético utilizando 5 grupos experimentales, a los cuales se les administraron 3 dosis de 88ug/kg en un período de 6 días, de las muestras de EPO-Fc de cultivo y leche, en condiciones nativas y desglicosiladas para cada caso.

El ensayo de actividad biológica *in vivo* reveló una disminución significativa en la actividad hematopoyética de la variante de EPO-Fc de cultivo cuando es sometida al tratamiento con PNGasa F, similar a la actividad observada por la EPO-Fc expresada en la glándula mamaria, en presencia o ausencia del tratamiento con PNGasa F (Fig. 19). Los resultados anteriormente descritos, indican que la actividad hematopoyética de la hEPO y su variante EPO-Fc, requiere un patrón de N-glicosilación específico tri o tetra antenarario y con la presencia de Ac. Siálico terminal. La diferencia significativa en la actividad *in vivo* de las variantes de EPO-Fc expresadas en cultivo y leche de cabras sugiere que además de la talla de la molécula, el patrón de glicosilación es un

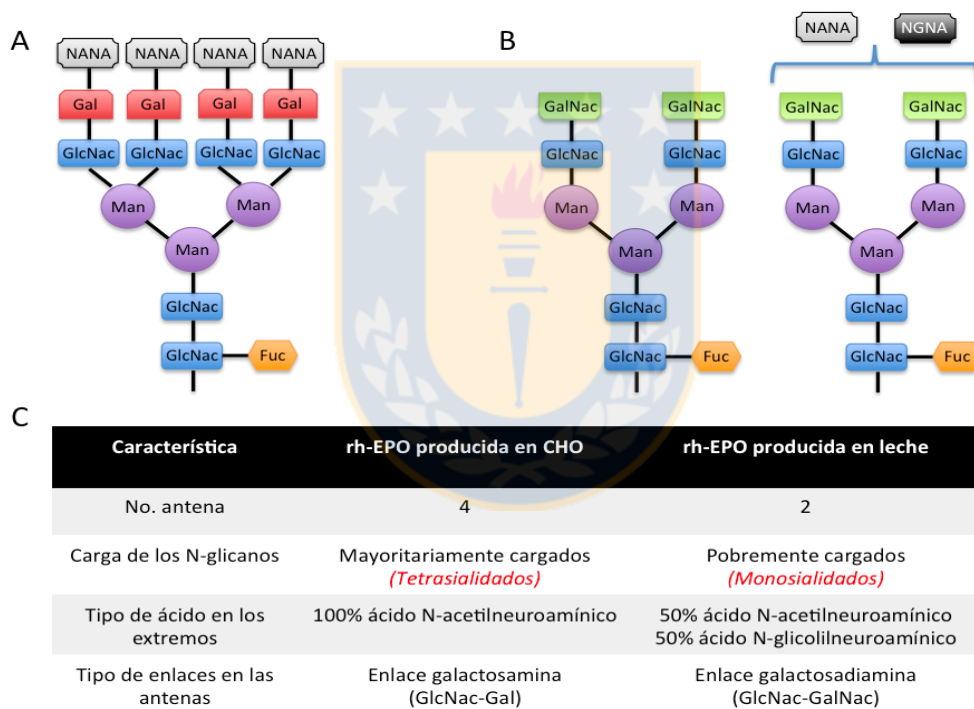
factor importante en la regulación de la actividad biológica de la hEPO. Así, se analizó el patrón diferencial de la proteína EPO-Fc expresado en la glándula mamaria de cabra, obteniéndose principalmente fracciones de EPO-Fc neutras y mono-sialiladas. En contraste, su variante expresada en cultivos de células SiHa mostró un porcentaje mayor de glicanos en la fracción de isoformas cargadas (Fig. 18-B). Estos resultados concuerdan con la evidencia previamente reportada, en donde se ha identificado que proteínas recombinantes expresadas en la glándula mamaria presentan mayoritariamente isoformas con una estructura di-antenaria mono-sialilada (Sánchez y cols., 2005). Lo anteriormente descrito, sugiere que estructuras glicosídicas completas son necesarias en la regulación de la biodisponibilidad y la actividad hematopoyética de la hEPO *in vivo*.



**Fig. 19. Actividad hematopoyética *in vivo* de variantes de EPO-Fc deglicosiladas.**

**A)** Cinética de actividad hematopoyética para EPO-Fc, determinada a partir del incremento del hematocrito en modelos murinos normocíticos inoculados con 3 dosis de cada muestra. Los puntos de las líneas de tendencia representan el promedio y la desviación estándar dentro del grupo experimental. El análisis estadístico de los datos se realizó respecto al grupo placebo, mediante la prueba de Dunnett y un ensayo One-Way ANOVA ( $p < 0.05$ ).

nativa (Fig. 20-A), favorecen la exposición de residuos de Galactosa y N-acetilgalactosamina, y su posterior reconocimiento, internalización y metabolización por los receptores de galactosa y manosa-3-fosfato presentes en el hígado, incrementando hasta siete veces la depuración de la molécula en modelos murinos (Wasley y cols.,2013). Mientras que ensayos de interacción *in vitro*, han dilucidado un mecanismo alternativo de depuración de hEPO circulante, el cual indica que la presencia de ácido neuroamínico terminal regula directamente la afinidad con la que se une hEPO con su receptor EPO-R, eludiendo procesos de internalización y degradación de la glicoproteína a través de la activación constitutiva de su receptor. (Gross y col., 2005).



**Fig. 20. Patrones de N-glicosilación asociados a las variantes de hEPO.**

**A)** Patrón de N-glicosilación tetra-antenario tetra-sialilado presente en hEPO expresada *in vitro* en cultivos de células de mamífero.

**B)** Patrón de N-glicosilación di-antenario mono-sialilado presente en hEPO expresada *in vivo* en la glándula mamaria.

**C)** Tabla comparativa para las variantes de hEPO recombinante expresadas *in vitro* e *in vivo*.

Los parámetros observados en el presente proyecto, junto con las referencias anteriormente descritas, sugieren que el factor determinante en la biodisponibilidad de la hEPO no solo resulta ser el tamaño de la molécula que regula su depuración renal (Montesino y cols., 2008), sino también la presencia de estructuras N-glicosídicas Tri o Tetra-antenarias sialiladas, que regulan mecanismos de depuración hepáticos e intracelulares de la hEPO circulante.





## V. DISCUSIÓN GENERAL

Los animales transgénicos como biorreactores constituyen una alternativa para la producción de proteínas recombinantes. No obstante, la generación de estos animales se convierte en un proceso largo, costoso y técnicamente exigente. La posibilidad de transformar genéticamente el epitelio mamario de animales adultos evade muchos de los inconvenientes asociados a la transgénesis (Rudolph, 1999; Niemann y Kues, 2003; Houdebine, 2000; Wheeler, 2003). A partir de la implementación de la transducción adenoviral *in situ* de la glándula mamaria de ruminantes ha permitido la expresión sostenida durante al menos 10 días de varias proteínas recombinantes a niveles de expresión que promedian 1 g/L. Como ejemplo podemos citar la hormona de crecimiento humana (Han y cols, 2009), la eritropoyetina humana (Liu y cols, 2010), la proteína E2 del virus de la peste porcina clásica (Sánchez y cols, 2014), el factor de crecimiento neuronal beta humano (Xiao y cols, 2009) y la lactoferrina humana (Han y cols, 2007).

En el presente trabajo se utilizó este método de transducción transitoria del epitelio mamario de mamíferos adultos, en el que se obtuvieron elevados niveles de expresión de proteínas recombinantes en la leche de cabras genéticamente transformadas (~4 g/L). La modificación genética *in situ* del epitelio mamario con vectores adenovirales permitió la transducción masiva de las células epiteliales mamarias de hembras adultas durante lactancia inducida hormonalmente y se pudo obtener la proteína recombinante EPO-Fc expresada en la leche en un intervalo de 11 a 14 días después de aplicado el procedimiento.

Utilizando un cultivo primario de células de glándula mamaria de cabra (GMEC) se evaluó la capacidad de los vectores adenovirales de primera generación para transducir eficientemente las células epiteliales del tejido alveolar mamario. Los

resultados obtenidos indicaron una expresión máxima del gen de EPO-Fc utilizando 75 UFC/célula. La elevada capacidad de transducción adenoviral mostrada por las células GMEC durante el ensayo permitió extrapolar los parámetros obtenidos en el modelo *in vitro* al modelo *in vivo* de la glándula mamaria.

Posteriormente, el método de transducción adenoviral se extendió a cabras, una especie con elevada capacidad productiva, y se obtuvieron **niveles de expresión promedio** de EPO-Fc de 4 g/L. Además, a través del método establecido por Toledo y colaboradores (2006) se logró la ruptura temporal de las uniones estrechas entre las células epiteliales mamarias, mediante la adición de EGTA al inóculo adenoviral. Este es un elemento muy importante en el procedimiento, puesto que permite la transducción del epitelio mamario durante la lactación inducida hormonalmente con una elevada eficiencia (Fig. 12).

Las principales desventajas del método propuesto radican en el corto tiempo de expresión (12 días en cabras) y en la imposibilidad de volver a transducir los animales con el vector adenoviral. Sin embargo, la potencialidad de este procedimiento como sistema productivo se refleja en los elevados rendimientos de proteína recombinante por animal. Tomando en cuenta los elementos de la dosis adenoviral óptima, el momento de inoculación y la adición de EGTA al inóculo, se logró la expresión de EPO-Fc en la leche de cabra durante la lactación activa, a niveles promedio de 4 g/L en los primeros 7 días de ordeño (Fig. 12-B). La capacidad del sistema para responder de forma expedita a la expresión de proteínas recombinantes en la leche de mamíferos, unido a los altos rendimientos de expresión y la simplicidad del procedimiento, lo convierte en una herramienta con un elevado potencial como posible sistema productivo.

Adicionalmente, en el presente estudio se diseñó una variante dimérica de hEPO unida al fragmento Fc de la IgG humana mediante técnicas de modelación y dinámica

molecular. La proteína quimérica expresada en cultivos celulares y en la glándula mamaria de cabras mostró una elevada estabilidad en su forma dimérica, identificándose una banda única mediante análisis en SDS-PAGE y Western Blot (Fig. 11 y 12). Por otra parte, la incorporación del fragmento Fc de la IgG humana en la construcción de la proteína de fusión EPO-Fc, permitió optimizar el proceso de purificación de la molécula mediante una sola etapa de cromatográfica utilizando una matriz de proteína A-Sefarosa (Fig. 13), a diferencia de las cinco etapas cromatográficas que son requeridos para la purificación de hEPO recombinante (Chu y cols., 2001; Dehnes, 2010; Lönnberg, 2010). Mediante el método utilizado se obtuvieron niveles de pureza de hasta un 95% y una eficiencia de hasta 5 mg/mL de matriz, lo cual evidencia las ventajas de utilizar el fragmento Fc de la IgG en la construcción de proteínas de fusión tal y como ha sido reportado en estudios previos (Hoffman y cols,200; Tutturro y cols, 2007).

Durante el desarrollo de este estudio, se evidenció además que la glicoproteína EPO-Fc expresada en la glándula mamaria de mamíferos (Fig. 14,15 y 18) presentaba una diferencia en la síntesis de los oligosacáridos N-enlazados a las subunidades hEPO, de forma similar a como se ha reportado anteriormente (Zhou y col., 2005; Montesinos y cols., 2008), con una glicoheterogeneidad desplazada principalmente hacia estructuras glicosídicas di-antenarias, y con una fracción mayoritaria de isoformas neutras y mono-sialiladas , en contraste de las isoformas expresadas en cultivos artificiales de mamífero que presentaron estructuras mayoritarias de tipo Tri y Tetra-antenarias multi-sialiladas(Fig. 17 y 20).

Los ensayos hematopoyéticos realizados en modelos murinos normocíticos evidenciaron un incremento significativo del hematocrito cercano al 17% en los grupos tratados con la proteína EPO-Fc respecto al monómero de hEPO, cuando la proteína quimérica es expresada en cultivos artificiales de células de mamíferos (Fig.14).

Adicionalmente, el ensayo de actividad biológica mostró un aumento en el tiempo de acción de EPO-Fc de 10 días respecto a los individuos tratados con hEPO (Fig.15). Los fenómenos anteriormente expuestos, podrían atribuirse a un incremento en la biodisponibilidad de la proteína de fusión EPO-Fc producto del aumento en su tamaño molecular y una disminución significativa de su depuración renal, tal como se esperaba y como ha sido evidenciado en la literatura (Strober y cols, 2007; Duchame y cols, 2008). De igual forma, se han dilucidado mecanismos alternativos que permiten la extensión de la vida media de proteínas de fusión Fc mediante la vía de reciclamiento de anticuerpos asociada al receptor neonatal del fragmento Fc (Fc-Rn) (Lencer y cols, 2005). Estas características en conjunto con la gran estabilidad observada por el dímero la glicoproteína EPO-Fc (Fig. 11 y 12), producto de los enlaces disulfuro intracatenarios generados por los dominios CH2 de la secuencia primaria de la IgG humana presente en el diseño de la molécula, demuestran las enormes ventajas de las proteínas de fusión unidas al fragmento Fc para su uso terapéutico.

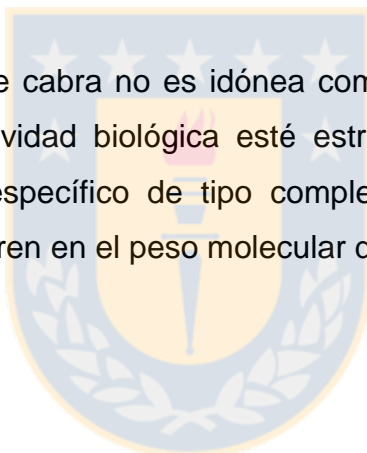
Sin embargo, opuesto a lo esperado, la actividad hematopoyética de la variante de EPO-Fc expresada en la glándula mamaria de cabra, presentó una actividad hematopoyética disminuida respecto a su homóloga de cultivo y al control de hEPO, con un incremento promedio del hematocrito de un 3% y un tiempo de acción de tan solo 12 días (Fig. 15). Un efecto similar se observó cuando la variante de EPO-Fc expresada en cultivos de células de mamífero, fue previamente tratada previamente con PNGasa F, evidenciando que isoformas N-desglicosiladas de la proteína quimérica presentan una actividad hematopoyética y una biodisponibilidad similar a la variante de EPO-Fc expresada en la glándula mamaria en presencia y ausencia del tratamiento con PNGasa F (Fig. 19).

En consecuencia, las diferencias identificadas en las estructuras glicosídicas N-enlazadas para las variantes de EPO-Fc en cultivo y en la glándula mamaria (Fig.15 y 19), indican que el tamaño de la molécula, y oligosacáridos N-enlazados son factores que afectan significativamente la actividad biológica de la hEPO. Finalmente, la evidencia actual sugiere fuertemente que las estructuras oligosacáridas N-enlazadas poseen un impacto incluso mayor en la vida media *in vivo* de la eritropoyetina humana, que el peso molecular de la proteína recombinante.

Así, el patrón de glicosilación específico de las proteínas expresadas en la glándula mamaria de cabra, podría atribuirse a una disminución o insuficiencia en la expresión de diversas glicosil-transferasas, tales como las enzimas GnTasa IV y V, debido a regulaciones tejido-específico presentes en el tejido epitelial mamario. Dichas enzimas se localizan a nivel del trans-Golgi y se ha observado que participan en la adecuada ramificación de residuos de galactosa característicos de las terminaciones N-Glicosídicas presentes en glicoproteínas de mamíferos. De esta forma, surgen diversas proyecciones para responder a las interrogantes generadas a partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo. Desde determinar la función biológica de las estructuras glicosídicas N-enlazadas a la variante quimérica EPO-Fc. Hasta evaluar diversas estrategias de humanización del tejido epitelial mamario, para establecer el uso de la glándula mamaria de mamíferos como una plataforma eficiente de proteínas recombinantes estructuralmente complejas con una actividad biológica semejante a la proteína nativa.

## VI. CONCLUSIONES

1. El método de transducción transitoria de la glándula mamaria con vectores adenovirales es una herramienta que posibilita el análisis expedito de nuevas variantes de proteínas recombinantes a expresar en la glándula mamaria.
2. La conformación de una variante dimérica de eritropoyetina potencia significativamente la actividad hematopoyética *in vivo* de la hormona cuando esta se expresa con un patrón de glicosilación semejante a la proteína nativa.
3. La glándula mamaria de cabra no es idónea como biorreactor para la expresión de glicoproteínas cuya actividad biológica esté estrechamente relacionada con un patrón de N-glicosilación específico de tipo complejo, independientemente de las modificaciones que se generen en el peso molecular de la hormona.



## VII. PROYECCIONES

1. Aplicar el sistema de transformación adenoviral en la glándula mamaria utilizando vectores de generaciones más avanzadas que permitan extender el tiempo de expresión de la proteína recombinante de interés, tales como vectores lentivirales o adenoasociados.
2. Diseñar ensayos de desglicosilación, desialización de las moléculas hEPO y EPO-Fc para conocer la función biológica de los glicanos N-asociados en la función hematopoyética de la molécula.
3. Realizar estudios para modificar el patrón de glicosilación de las proteínas expresadas en la glándula mamaria de cabra hacia fenotipos de glicoproteínas humanas con un potencial uso terapéutico.
4. Extender las aplicaciones del sistema de expresión a otras glicoproteínas recombinantes cuya actividad biológica no dependa de un patrón de glicosilación específico.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre A., Castro-Palomino N., De la Fuente J. y Castro F.O., (1998). Expression of human erythropoietin transgenes and of the endogenous WAP gene in the mammary gland of transgenic rabbits during gestation and lactation. *Transgenic Research*. **7**: 311-317.
- Aigner B., Pambalk K., Reichart U., Besenfelder U., Bosze Z., Renner M., Gunzburg W.H., Wolf E., Muller M. y Brem G., (1999). Species-specific alternative splicing of transgenic RNA in the mammary glands of pigs, rabbits, and mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**: 843-850.
- Allen J.C., (1990). Milk synthesis and secretion rates in cows with milk composition changed by oxytocin. *J. Dairy Science*. **73**: 975-984.
- Amalfitano A., Hauser M.A., Hu H., Serra D., Begy C.R. y Chamberlain J.S., (1998). Production y characterization of improved adenovirus vectors with the E1, E2b, and E3 genes deleted. *J. Virol.* **72**: 926-933.
- Ammarguella F., Llovera M., Kelly P.A. y Goldwasser E., (2001). Low doses of EPO activate MAP kinases but not JAK2/STAT5 in rat vascular smooth muscle cells. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* **284**: 1031-1038.
- Andersen D.C. y Krummen L., (2002). Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**: 117-123.
- Archer J.S., Kennan W.S., Gould M.N. y Bremel R.D., (1994). Human growth hormone (hGH) secretion in milk of goats after direct transfer of the hGH gene into the mammary gland by using replication-defective retrovirus vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 6840-6844.
- Aricedo AR, Owens RJ. (2013) Expression of recombinant glycoproteins in mammalian cells: towards an integrative approach to structural biology. doi: 10.1016/j.sbi.2013.04.003
- Baldassarre H., Wang B., Kafidi N., Gauthier M., Neveu N., Lapointe J., Sneek L., Leduc M., Duguay F., Zhou J.F., Lazaris A. y Karatzas C.N., (2003) Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of in vitro produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. *Theriogenology*. **59**: 831-839.
- Bao L., Jaligam V., Zhang X.Y., Kutner R.H., Kantrow S.P. y Reiser J., (2004). Stable transgene expression in tumors and metastases after transduction with lentiviral vectors based on human immunodeficiency virus type 1. *Hum Gene Ther.* **15**: 445-456.



- Bardor M., Faveeuw C., Fitchette A.C., Gilbert D., Galas L., Trottein F., Faye L. y Lerouge P., (2003). Immunoreactivity in mammals of two typical plant glyco-epitopes, core a(1,3)-fucose and core xylose. *Glycobiology*. **13**: 427-434.
- Belousova N., Krendelchtchikova V., Curie D.T. y Krasnykh V., (2002). Modulation of Adenovirus Vector Tropism via Incorporation of Polypeptide Ligands into the Fiber Protein. *Journal of Virology*. **76**: 8621-8631.
- Benihoud K., Yeh P. y Perricaudet M. (1999). Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**: 440-447.
- Bergelson J.M., Cunningham J.A., Droguett G., Kurt-Jones E.A., Krithivas A., Hong J.S. (1997). Isolation of common receptor for coxsackie B viruses and adenovirus 2 and 5. *Science*. **275**: 1320-1323.
- Bergelson J.M., Krithivas A., Celi L., Droguett G., Horwitz M.S., Wickham T. y Finberg R.W., (1998). The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B virus and adenoviruses. *Journal of Virology*. **72**: 415-419.
- Berthold W. y Walter J., (1994). Protein purification: aspects of processes for pharmaceutical products. *Biologicals*. **22**: 135-150.
- Birnboim H.C. y Doly J., (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1515.
- Blixt O., Allin K., Pereira L., Datta A. y Paulson J.C., (2002). Efficient chemoenzymatic synthesis of O-linked sialyl oligosaccharides. *J. Am. Chem. Soc.* **124**: 5739-5746.
- Brem G., (1993). Transgenic animals. *Biotechnology*, ed. Rehm, H. J. & Reed, G., pp. 745-832. VCH, Weinheim.
- Brem G., Brenig B., Goodman H. M., Selden R. C., Graf F., Kruff B., Springmann K., Hondele J., Meyer J., Winnacker E.L. y Kr. ausslich H., (1985). Production of transgenic mice, rabbits and pigs by microinjection into pronuclei. *Zuchthygiene*. **20**: 251-252.
- Brem G., Hartl P., Besenfelder U., Wolf E., Zinovieva N. y Pfaller R., (1994). Expression of synthetic cDNA sequences encoding human insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in the mammary gland of transgenic rabbits. *Gene*. **149**: 351-355.
- Bromberg J.S., Debruyne L.A. y Qin L., (1998). Interactions between the immune system and gene therapy vectors: bidirectional regulation of response and expression. *Adv. Immunol.* **69**: 353-409.
- Buhler T.A., Bruyere T., Went D.F., Stranzinger G. y Burki K., (1990). Rabbit beta-casein promoter directs secretion of human interleukin-2 into the milk of transgenic rabbits. *Biotechnology*. **8**: 140-145.

- Burnett N., (1981). Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate-poliacrilamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. *A. Anal. Biochem.* **112**:195-203.
- Butler S.P., van Cott K., Subrumanian A., Gwazduaskas F.C. y Velander W.H., (1997). Current progress in the production of recombinant human fibrinogen in the milk of transgenic animals. *Thromb Haemost.* **78**: 537-542.
- Cammuso C., Porter C., Nims S., Gaucher D., Melican D., Bombard S., Hawkins N., O'Coin A., Ricci C., Brayman C., Buzzell N., Ziomek C. y Gavin W., (2000). Hormonal induced lactation in transgenic goats. *Anim. Biotechnol.* **11**:1-17.
- Campbell K.H., McWhir J., Ritchie W.A. y Wilmut I., (1996). Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature.* **380**: 64-66.
- Chan A.W.S., Homan E.J., Ballou L.U., Burns J.C. y Bremel D.R., (1998). Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 14028-14033.
- ChiuCh.Y., WuE., BrownS.L., Von Seggern D.J., NemerowG.R. y Stewart P.L., (2001). Structural Analysis of a Fiber-Pseudotyped Adenovirus with Ocular Tropism Suggests Differential Modes of Cell Receptor Interactions. *Journal of Virology.* **75**: 5375-5380.
- Chomczynski P. y Sacchi N., (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochem.* **162**: 156-159.
- Chou H.H., Takematsu H., Diaz S., Iber J., Nickerson E., Wright K.L., Muchmore E.A., Nelson D.L., Warren S.T. y Varki A., (1998). A mutation in human CMP-sialic acid hydroxylase occurred after the Homo-Pan divergence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **95**: 11751-11756.
- Chu L. y Robinson D.K., (2001). Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**: 180-187.
- Chung J.H., Whiteley M. y Felsenfeld G., (1993). A 5' element of the chicken beta-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*. *Cell.* **74**: 505-514.
- Cibelli J.B., Stice S.L., Golueke P.J., Kane J.J., Jerry J. y Blackwell C., (1998). Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science.* **280**: 1256-1258.
- Clark A.J., (1998) Gene expression in the mammary glands of transgenic animals. *Biochem. Soc. Symp.* **63**: 133-140.

- Clark A.J., Ali S., Archibald A.L., Bessos H., Brown P., Harris S., McClenaghan M., Prowse C., Simons J.P., Whitelaw C.B. y col., (1989). The molecular manipulation of milk composition. *Genome*. **31**: 950-955.
- Clark A.J., Bissinger P., Bullock D.W., Damak S., Wallace R., Whitelaw C.B., *et al.* (1994). Chromosomal position effects and the modulation of transgene expression. *Reprod. Fertil. Dev.* **6**: 589-598.
- Cohen C.J., Shieh J.T., Pickles R.J., Okegawa T., Hsieh J.T. y Bergelson J.M., (2001). The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 15191-15196.
- Colman A., (1998). Production of therapeutic proteins in the milk of transgenic livestock. *Biochem. Soc. Symp.* **63**: 141-147.
- Colman A., (1999). Dolly, Polly and other 'ollys': likely impact of cloning technology on biomedical uses of livestock. *Genet. Anal.* **153**: 167-173.
- Coulibaly S., Besenfelder U., Fleischmann M., Zinovieva N., Grossmann A., Wozny M., Bartke I., Togel M, Muller M. y Brem G., (1999). Human nerve growth factor beta (hNGF-beta): mammary gland specific expression and production in transgenic rabbits. *FEBS Lett.* **444**: 111-116.
- Crystal R.G., (1995). Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. *Science*. **270**: 404-410.
- Danthinne X. e Imperiale M.J., (2000). Production of first generation adenovirus vectors: a review. *Gene Ther.* **7**: 1707-1714.
- Darling R.J., Kuchibhotla U., Glaesner W., Micanovic R., Witcher D.R. y Beals J.M., (2002). Glycosylation of erythropoietin affects receptor binding kinetics: role of electrostatic interactions. *Biochemistry*. **41**: 14524-31
- De Duve C., (1991). *Blueprint for a cell: The nature and origen of life*. Neil Patterson Publishers, Burlington, North Carolina.
- Devinoy E., Thepot D., Stinnakre M.G., Fontaine M.L., Grabowski H., Puissant C., Pavirani A. y Houdebine L.M., (1994). High level production of human growth hormone in the milk of transgenic mice: the upstream region of the rabbit whey acidic protein (WAP) gene targets transgene expression to the mammary gland. *Transgenic Res.* **3**: 79-89.
- Dehnes Y, Lamon S, Lönnberg M. (2010) Erythropoietin (EPO) immunoaffinity columns--a powerful tool for purifying EPO and its recombinant analogues. *J Pharm Biomed Anal.* Dec 1;53(4):1028-32. doi: 10.1016/j.jpba.2010.06.017. Epub 2010 Jun 26.
- Dillon N. y Grosveld F., (1993). Transcriptional regulation of multigene loci: multilevel control. *Trends Genet.* **9**: 134-137.

- Do K-Y., Do S-I. y Cummings R.D., (1995).  $\alpha$ -Lactalbumin induces bovine milk  $\alpha$ 1,4 Galactosyltransferase to utilize UDP-GalNAc. *J. Biol. Chem.* **270**: 18447-18451.
- Domon B. y Costello C.E., (1988). A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentation in FABMS/MS of glycoconjugates. *Glycoconj. J.* **5**: 397-409.
- Dordal M.S., Wang F.F. y Goldwasser E., (1985). The role of carbohydrate in erythropoietin action. *Endocrinology.* **116**: 2293-2299.
- Doronin K., Toth K., Kuppaswamy M., Krajcsi P., Tollefson A.E. y Wold W.S., (2003). Overexpression of the ADP (E3-11.6K) protein increases cell lysis and spread of adenovirus. *Virology.* **305**: 378-387.
- Drury L., (1994). Transformation of bacteria by electroporation. *Methods Mol Biol.* **31**: 1-8.
- Dwek R.A. y Quicho F.A., (1991). Carbohydrates and Glycobiology. *Current Op. Structural Biol.* **1**: 709-710.
- Dyck M.K., Gagne D., Ouellet M., Senechal J.F., Belanger E., Lacroix D., Sirard M.A. y Pothier F., (1999). Seminal vesicle production and secretion of growth hormone into seminal fluid. *Nat Biotechnol.* **17**: 1087-1090.
- Ebert K.M., DiTullio P., Barry C.A., Schindler J.E., Ayres S.L., Smith T.E., Pellerin L.J., Meade H.M., Denman J. y Roberts B., (1994). Induction of human tissue plasminogen activator in the mammary gland of transgenic goats. *Biotechnology.* **12**: 699-702.
- Edmunds T., Van Patten S.M., Pollock J., Hanson E., Bernasconi R., Higgins E., Manavalan P., Ziomek C., Meade H., McPherson J.M. y Cole E.S., (1998). Transgenically produced human antithrombin: structural and functional comparison to human plasma-derived antithrombin. *Blood.* **91**: 4561-4571.
- Elliott S., Egrie J., Browne J., Lorenzini T., Busse L., Rogers N. y Ponting I., (2004). Control of rHuEPO biological activity: the role of carbohydrate. *Exp. Hematol.* **32**: 1146-55.
- Erslev, A.J.(1953) Humoral Regulation of Red Cell Production. *Blood* **8**: 349-357, 1953.
- Evans J.D. y Hearing P., (2003). Distinct Roles of the Adenovirus E4 ORF3 Protein in Viral DNA Replication and Inhibition of Genome Concatenation. *Journal of Virology.* **77**: 5295-5304.
- Facklam T.J. y Geyer S., (1991). The preparation and validation of stock cultures of mammalian cells. *Bioprocess Technol.* **13**: 54-85.

- Fallaux F.J., Bout A., Van der Velde I. y Hauser H., (1998). New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum. Gene Therapy*. **9**: 1909-1917.
- Fan W., Plaut K., Bramley A.J., Barlow J.W. y Kerr D.E., (2002). Adenoviral-mediated transfer of a lysostaphin gene into the goat mammary gland. *J Dairy Sci*. **85**: 1709-1716.
- Fan W., Plaut K., Bramley A.J., Barlow J.W., Mischler S.A. y Kerr D.E., (2004). Persistency of adenoviral-mediated lysostaphin expression in goat mammary glands. *J Dairy Sci*. **87**: 602-608.
- Fauser B.C.J.M., B.M.J.L. Mannaerts. , (2009). Advances in recombinant DNA technology: corifollitropin alfa, a hybrid molecule with sustained follicle-stimulating activity and reduced injection frequency. *Human Reproduction Update*, **309**–321
- Fernandez-de-Cossio J., Gonzalez L.J., Satomi Y., Betancourt L., Ramos Y., Huerta V., Amaro A., Besada V., Padron G., Minamino N. y Takao T., (2004). Isotopica: a tool for the calculation and viewing of complex isotopic envelopes. *Nucleic Acids Res*. **1**: 32. (Web Server issue): W674-8.
- Ferreira T.B., Alves P.M., Aunins J.G. y Carrondo M.J., (2005). Use of adenoviral vectors as veterinary vaccines. *Gene Ther*. **1**:73-83.
- Fleet I.R., Goode J.A., Hamon M.H., Laurie M.S., Linzell J.L. y Peaker M., (1975). Secretory activity of goat mammary glands during pregnancy and the onset of lactation. *J .Physiology*. **251**: 763-773.
- Fisher J.W., (1972). Erythropoietin: Pharmacology, Biogenesis and Control of Production. *Pharmacol. Rev*. **24**: 459-508.
- Follenzi A., Ailles L.E., Bakovic S., Geuna M. y Naldini L., (2000). Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. *Nat Genet*. **25**: 217-222.
- Forrester W.C., van Genderen C., Jenuwein T. y Grosschedl R., (1994). Dependence of enhancer-mediated transcription of the immunoglobulin gene on nuclear matrix attachment regions. *Science*. **265**: 1221-1225.
- Fratantoni J.C. y Seamon K.B., (1994). Evaluation of Recombinant Human Erythropoiein as a Therapeutic Agent. In Book: Regulatory Practice for Biopharmaceutical Production. Edited by Anthony S. Lubiniecki and Susan A. Vargo.

- Freydell EJ, van der Wielen LA.,(2011). Techno-economic evaluation of an inclusion body solubilization and recombinant protein refolding process. *Biotechnol Prog.* **25**: 217-222.
- Furth P.A., Shamay A., Wall R.J. y Hennighausen L. (1992). Gene transfer into somatic tissues by jet injection.*Anal. Biochem.* **205**: 365-368.
- Georgiou G. y Valax P., (1996).Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*.*Curr. Opin. Biotechnol.* **7**: 190-197.
- Gerngross T.U., (2004). Advances in the production of human therapeutic proteins in yeast and filamentous fungi. *Nature Biotech.* **22**: 1409-1414.
- Ghazizadeh S., Kalish R.S. y Taichman L.B., (2003). Immune-mediated loss of transgene expression in skin: implications for cutaneous gene therapy. *Mol. Ther.* **7**:296-303
- Golovkina T.V., Prakash O. y Ross S.R., (1996). Endogenous mouse mammary tumor virus Mtv-17 is involved in Mtv-2-induced tumorigenesis in GR mice.*Virology.* **218**: 14-22.
- Gordon J.W., Scangos G.A., Plotkin D.J., Barbosa A. y Ruddle, F.H., (1980). Genetic transformation of mouse embryos by microinjection. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **77**: 7380-7384.
- Gordon K., Lee E., Vitale J.A., Smith A.E., Westphal H. y Hennighausen L., (1992). Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk, 1987. *Biotechnology.* **24**: 425-428.
- Graham F.L. y Prevec L., (1995). Methods for construction of adenovirus vectors.*Mol. Biotechnol.***3**: 207-220.
- Grand R.J., Schmeiser K., Gordon E.M., Zhang X., Gallimore P.H. y Turnell A.S. (2002). Caspase-mediated cleavage of adenovirus early region 1A proteins. *Virology.***301**: 255-271.
- Grave L., Dreyer D., Dieterle A., Leroy P., Michou A.I., Doderer C., Pavirani A., Lusky M. y Mehtali M., (2000).Differential influence of the E4 adenoviral genes on viral and cellular promoters. *J. Gene Med.* **2**: 433-443.
- Groner B., (2002). Transcription factor regulation in mammary epithelial cells.*Domest. Anim. Endocrinol.***23**:25-32.
- Gross A., Harvey F., (2006). Cellular Trafficking and Degradation of Erythropoietin and Novel Erythropoiesis Stimulating Protein (NESP). *The journal of biological chemistry* vol. 281, no. 4, pp. 2024–2032

- Hammer R. E., Pursel V. G., Rexroad C. E. Jr, Wall R. J., Bolt D. J., Ebert K. M., Palmiter R. D. y Brinster R. L., (1985). Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*. **315**:680-683.
- Haskell R. y Bowen R.A., (1995). Efficient production of transgenic cattle by retroviral infection of early embryos. *Mol Reprod Dev*. **40**: 386-390.
- Hayflick L. y Moorhead P.S., (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res*. **25**: 585-621.
- He T.C., Zhou S., Da Costa L.T., Yu J., Kinzler K.W. y Vogelstein B.A., (1998). Simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **95**: 2509-2514,
- Hens J.R., Amstutz M.D., Schanbacher F.L. y Mather I.H., (2000). Introduction of the human growth hormone gene into the guinea pig mammary gland by in vivo transfection promotes sustained expression of human growth hormone in the milk throughout lactation. *Biochim. Biophys. Acta*. **1523**: 161-171.
- Herbers K. y Sonnewald U., (1999). Production of new/modified proteins in transgenic plants. *Curr. Opin. Biotechnol*. **10**: 163-168.
- Hercovics A. y Orlean P., (1993). Glycoprotein biosynthesis in yeast. *FASEB J*. **7**: 540-550.
- Hesse F. y Wagner R., (2000). Developments and improvements in the manufacturing of human therapeutics with mammalian cell cultures. *Trends Biotechnol*. **18**: 173-180.
- Hill J.R., Rousell A.J., Cibelli J.B., Edwards J.F., Hooper N.L., Miller M.W., Thompson J.A., Looney C.R., Robl J.M., Westhusin M.E. y Stice S.L., (1999). Clinical and pathological features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). *Theriogenology*. **51**: 1451-1465.
- Hodgson J., (1993). Expression systems: a user's guide. Emphasis has shifted from the vector construct to the host organism. *Biotechnology*. **11**: 887-893.
- Hofmann A., Kessler B., Ewerling S., Weppert M., Vogg B., Ludwig H., Stojkovic M., Boelhauve M., Brem G., Wolf E. y Pfeifer A., (2003). Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. *EMBO Rep*. **4**: 1054-1060.
- Hofmann A., Zakhartchenko V., Weppert M., Sebald H., Wenigerkind H., Brem G., Wolf E. y Pfeifer A., (2004). Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes. *Biol. Reprod*. **71**: 405-409.
- Houdebine L.M., (2000). Transgenic animal bioreactors. *Transgenic Res*. **9**: 305-320.
- Hu W.S. y Aunins J.G., (1997). Large-scale mammalian cell culture. *Curr. Opin. Biotech*. **8**: 148-153.



- Ikawa M., Tanaka N., Kao W.W. y Verma I.M., (2003). Generation of transgenic mice using lentiviral vectors: a novel preclinical assessment of lentiviral vectors for gene therapy. *Mol. Ther.* **8**: 666-673.
- Ikeda Y., Yamaoka K., Noda M. y Ogino T., (2003). Genome types of adenovirus type 7 isolated in Hiroshima City. *J. Med. Virol.* **69**: 215-219.
- Jacobs K., Shoemaker C., Rudersdorf R., Neill S.D., Kaufman R.J., Mufson A., Seehra J., Jones S.S., Hewick R. y Fritsch E.F., (1985). Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature.* **313**: 806-810.
- Jaenisch R., (1974). Infection of mouse blastocysts with SV 40 DNA: normal development of infected embryos and persistence SV 40-specific DNA sequences in the adult animals. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **39**: 375-380.
- Jaenisch R., (1976). Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukemia virus. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **73**: 1260-1267.
- Jahner D. y Jaenisch R., (1985). Retrovirus-induced de novo methylation of flanking host sequences correlates with gene inactivity. *Nature.* **315**: 594-597.
- Jeng M.H., Kao C., Sivaraman L., Krnacik S., Chung L.W., Medina D., Conneely O.M. y O'Malley B.W., (1998). Reconstitution of estrogen-dependent transcriptional activation of an adenoviral target gene in select regions of the rat mammary gland. *Endocrinology.* **139**: 2916-2925.
- Kamen A. y Henry O., (2004). Development and optimization of an adenovirus production process. *J. Gene Med.* **1**: 184-192.
- Kasamatsu H. y Nakanishi A., (1998). How do animal DNA viruses get to the nucleus. *Ann. Rev. Microbiol.* **52**: 627-686.
- Kaufman R.J., (1998). Post-translational modifications required for coagulation factor secretion and function. *Thromb. Haemost.* **79**: 1068-1079.
- Kawakami Y., Li H., Lam J.T., Krasnykh V., Curiel D.T. y Blackwell J.L., (2003). Substitution of the adenovirus serotype 5 knob with a serotype 3 knob enhances multiple steps in virus replication. *Cancer Res.* **63**: 1262-1269.
- Keefer C.L., (2004). Production of bioproducts through the use of transgenic animal models. *Anim. Reprod. Sci.* **83**: 5-12.
- Kerr D.E., Furth P.A., Powell A.M. y Wall R.J., (1996). Expression of gene-gun injected plasmid DNA in the ovine mammary gland and in lymph nodes draining the injected site. *Animal Biotechnology.* **7**: 33-45.



- Kerr D.E., Liang F., Bondioli K.R., Zhao H., Kreibich G., Wall R.J. y Sun T.T., (1998). The bladder as a bioreactor: urothelium production and secretion of growth hormone into urine. *Nat. Biotechnol.* **16**: 75-79.
- Kirby I., Davison E., Beavil A.J., Soh C., Wickham T.J., Roelvink P.W., Kovesdi I., Sutton B.J. y Santis G., (2000). Identification of Contact Residues and Definition of the CAR-Binding Site of Adenovirus Type 5 Fiber Protein. *J. Virol.* **74**: 2804-2813.
- Kobata A., (1992). Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins. *Eur. J. Biochem.* **209**: 483-501.
- Kochanek S., Schiedner G. y Volpers C., (2001). High-capacity 'gutless' adenoviral vectors. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **3**: 454-463.
- Kornfeld R. y Kornfeld S., (1985). Assambly of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann.Rev. Biochem.* **54**: 631-664.
- Korhonen V.P., Tolvanen M., Hyttinen J.M., Uusi-Oukari M., Sinervirta R., Alhonen L., Jauhiainen M., Janne O.A. y Janne J., (1997). Expression of bovine beta-lactoglobulin/human erythropoietin fusion protein in the milk of transgenic mice and rabbits. *Eur. J. Biochem.* **245**: 482-489.
- Korner C., Knauer R., Stephani U., Marquardt T., Lehle L. y von Figura K., (1999). Carbohydrate deficient glycoprotein syndrome type IV: deficiency of dolichyl-P-Man:Man(5)GlcNAc(2)-PP-dolichyl mannosyltransferase. *EMBO J.* **18**: 6816-6822.
- Krantz S.B., (1991). Erythropoietin. *Blood.* **77**: 419-434.
- Krnacik M.J., Li S., Liao J. y Rosen J.M., (1995). Position-independent expression of whey acidic protein transgenes. *J. Biol. Chem.* **270**: 11119-11129.
- Laemmli U.K., (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680-685.
- Lai H., Everett R., Wanggt F.F., Arakawn T. y Goldwasser E., (1995). Estructural Characterization of human erythropoietin. *J. Biol. Chem.* **85**: 315-320.
- Lappin T.R., Maxwell P. y Johnston P.G., (2002). EPO's alter ego: Erythropoietin has multiple actions. *Stem Cells.* **20**: 485-492.
- Lewezuk P., Hasselblatt M., Kamrowski-Kruck H., Zhou H., Parks R.J. y Velji R., (2000). Survival of hippocampal neurons in culture upon hypoxia: effect of erythropoietin. *Neuroreport.* **11**: 3485-3488.
- Lin F.K., Suggs S., Lin C.H., Browne J.K., Smalling R., Egrie J.C., Chen K.K., Fox G.M., Martin F. y Stabinsky Z., (1985). Cloning and expression of the human erythropoietin gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**: 7580-7584.

- Linzell J.L. y Peaker M., (1971). The permeability of mammary ducts. *J. Physiology*. **216**: 701-716.
- Lipinski D., Jura J., Kalak R., Plawski A., Kala M., Szalata M., Jarmuz M., Korcz A., Slomska K., Jura J., Groniek P., Smorag Z., Pienkowski M. y Slomski R., (2003). Transgenic rabbit producing human growth hormone in milk. *J. Appl. Genet.* **44**: 165-174.
- Lo D., Pursel V., Linton P.J., Sandgren E., Behringer R., Rexroad C., Palmiter R.D. y Brinster R.L., (1991). Expression of mouse IgA by transgenic mice, pigs and sheep. *Eur J Immunol.* **21**: 1001-1006.
- Lönnerberg M, Dehnes Y, Drevin M, Garle M, Lamon S, Leuenberger N, Quach T, Carlsson J. (2010) Rapid affinity purification of erythropoietin from biological samples using disposable monoliths. *J Chromatogr A.* Nov 5;1217(45):7031-7. doi: 10.1016/j.chroma.2010.09.034. Epub 2010 Sep 17.
- Lortat-Jacob H., Chouin E., Cusack S. y van Raaij M.J., (2001). Kinetic Analysis of Adenovirus Fiber Binding to Its Receptor Reveals an Avidity for Trimeric Receptor-Ligand Interactions. *J. Biol. Chem.* **276**: 9009-9015.
- Lusky M., Christ M., Rittner K., Kochanek S., Carey K. D., Beudet A. L., (1998). *In vitro* and *in vivo* biology of recombinant adenovirus vectors E1, E1/E2, or E1/E4 deleted. *J. Virol.* **72**: 2022-2032.
- Manzella S.M., Hooper L.V. y Baenziger J.U., (1996). Oligosaccharides containing 1,4-linked N-Acetylgalactosamine, a paradigm for protein-specific glycosylation. *J. Biol. Chem.* **271**: 12117-12120.
- Marino M.H., (1989). Expression systems for heterologous protein production. *Biopharm.* **2**: 18-33.
- Marti H.H., Wenger R.H., Rivas L.A., Manavalan P., Ziomek C. y Meade H., (1996). Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur. J. Neurosci.* **8**: 666-676.
- Mason H.S., Warzecha H., Mor T. y Arntzen C.J., (2002). Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine. *Trends Mol. Med.* **8**: 324-329.
- Massoud M., Attal J., Thepot D., Pointu H., Stinnakre M.G., Theron M.C. y Houdebine L.M., (1996). The deleterious effects of human erythropoietin gene driven by the rabbit whey acidic protein gene promoter in transgenic rabbits. *Reprod. Nutr. Dev.* **36**: 555-563.
- Massoud M., Bischoff R., Dalemans W., Pointu H., Attal J., Schultz H., Clesse D., Stinnakre M.G., Pavirani A. y Houdebine L.M., (1991). Expression of active recombinant human alpha 1-antitrypsin in transgenic rabbits. *J. Biotechnol.* **18**: 193-203.

- Masuda S., Okano M., Yamagishi K. y Takahata K.A., (1994). Novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J. Biol. Chem.* **269**: 19488-19493.
- Maxwell A.P., (2002). Novel erythropoiesis stimulating protein in the management of the anemia of chronic renal failure. *Kidney Int.* **62**: 720-729.
- Mayer M. y Buchner J., (2004). Refolding of inclusion body proteins. *Methods Mol. Med.* **94**: 239-254.
- McCormick F., (2001). Cancer gene therapy: Fringe or cutting edge?. *Nature.* **1**: 130-140.
- McGonigle R.J., Wallin J.D., Shadduck R.K. y Fisher J.W., (1984). Erythropoietin deficiency and inhibition of erythropoiesis in renal insufficiency. *Kidney. Int.* **25**: 437-444.
- Meade H.M., (1999). Gene Expression Systems: Using Nature for the Art of Expression. pp. 399-427. Ed by Fernandez J.M. y Hoeffler J.M. Academic Press.
- Meissner P., Pick H., Kulangara A., Chatellard P., Friedrich K. y Wurm FM.(2001). Transient Gene Expression: Recombinant Protein Production with Suspension-Adapted HEK-293EBNA Cells.*Biotech. and Bioeng.* **75**: 197-203.
- Mikus T., Maly P., Poplstein M., Landa V., Trefil P., Lidicky J., (2001). Expression of human erythropoietin gene in the mammary gland of a transgenic mouse, *Folia. Biol. Praha.* **47**: 187-195.
- Montesino R. , Toledo JR., Sánchez O., Sánchez A., Harvey DJ., Royle L., Dwek RA., Rudd PM., Gerwig GJ., Kamerling JP., Cremata JA. (2008) Monosialylated biantennary N-glycoforms containing GalNAc-GlcNAc antennae predominate when human EPO is expressed in goat milk. *Arch Biochem Biophys.* Feb 15;470(2):163-75. Epub 2007
- Misaizu T., Matsuki S., Strickland T.W., Takeuchi M., Kobata A. y Takasaki S., (1995). Role of antennary structure of N-linked sugar chains in renal handling of recombinant human erythropoietin. *Blood.* **86**: 4097-4104.
- Mitchell C.A., Guerin L.F. y Pasiaka A.E., (1967). Antibody production in milk serum after virus instillation of goat mammary gland. Responses to influenza virus, mumps virus, and adenovirus 3. *Can. J. Microbiol.* **13**: 1069-78.
- Molowa D.T. y Mazanet R., (2003). The state of biopharmaceutical manufacturing. *Biotechnol. Annu. Rev.* **9**: 285-302.
- Morell A.G., Gregoriadis G., Scheinberg I.H., Hickman J., Ashwell G., (1971). The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation. *J. Biol. Chem.* **246**: 1461-1467.
- Morimoto K., Tsuda E., Abdu-Said A., Uchida E., Hatakeyama S. y Ueda M., (1996).

Biological and physicochemical characterization of recombinant human erythropoietins fractionated by Mono Q column chromatography and their modification with sialyltransferase. *Glycoconjugate*. **13**: 1013-1020.

- Morral N., O'Neal W., Rice K., Leland M., Kaplan J., Piedra P. A., (1999). Administration of helper-dependent adenoviral vectors and sequential delivery of different vector serotype for long-term liver-directed gene transfer in baboons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 12816-12821.
- Musher M.D., (2003). How contagious are common respiratory tract infections?. *The new england J. of Med.* **348**: 1256-1266.
- Nadeau I. y Kamen A., (2003). Production of adenovirus vector for gene therapy. *Biotechnol Adv.* **20**: 475-489.
- Nagai A., Nakagawa E., Choi H.B. y Nakashima Y., (2001). Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, microglia, and oligodendrocytes grown in culture. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **60**: 386-392.
- Nakata N., Furukawa K., Greenwalt D.E., Sato T. y Kobata A., (1993). Structural study of the sugar chains of CD36 purified from bovine mammary epithelial cells: Occurrence of novel Hybrid-type sugar chains containing Neu5Ac 2-6GalNAc 1-4GlcNAc and Man 1-2Man 1-3Man 1-6Man groups. *Biochemistry.* **32**: 4369-4383.
- Narhi L.O., Arajawa T., Aoki K.H., Elmore R., Rohde M. F., Boone T. y Strickland T.W., (1991). The effect of carbohydrate in the structure and stability of erithropoietin. *J. Biol. Chem.* **266**: 23022-23026.
- Nguyen D.A. y Neville M.C., (1998). Tight junction regulation in the mammary gland. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* **3**: 233-246.
- Nguyen D.A., Parlow A.F. y Neville M.C., (2001). Hormonal regulation of tight junction closure in the mouse mammary epithelium during the transition from pregnancy to lactation. *J Endocrinol.* **170**:347-356.
- Niemann H. y Kues W.A., (2003). Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine. *Anim. Reprod. Sci.* **79**: 291-317.
- Niemann H., Halter R., Carnwath J.W., Herrmann D., Lemme E. y Paul D., (1999). Expression of human blood clotting factor VIII in the mammary gland of transgenic sheep. *Transgenic Res.* **8**: 237-247.
- Nishikawa A. y Mizuno S., (2001). The efficiency of N-linked glycosylation of bovine DNase I depends on the Asn-Xaa-Ser/Thr sequence and the tissue of origin. *Biochem. J.* **355**: 245-248.
- Nyberg-Hoffman C. y Aguilar-Cordova E., (1999). Instability of adenoviral vectors during transport and its implication for clinical studies. *Nat. Med.* **5**: 955-957.

- Obermeyer G., Gehwolf R., Sebesta W., Hamilton N., Gadermaier G., Ferreira F., Commandeur U., Fischer R. y Bentrup F.W. (2004). Over-expression and production of plant allergens by molecular farming strategies. *Methods*. **32**: 235-240.
- O'Connor S.E. e Imperiali B., (1996). Modulation of protein structure and function by asparagine-linked glycosylation. *Chem. Biol.* **3**: 803-812.
- Okutani Y., Kitanaka A., Tanaka T., Kamano H., Ohnishi H. y Kubota Y., (2001). Src directly tyrosine-phosphorylates STAT5 on its activation site and is involved in erythropoietin-induced signaling pathway. *Oncogene*. **20**: 6643-6650.
- Olsen N., (2003). Central nervous system frontiers for the use of erythropoietin. *Clin. Infect. Dis.* **37**: 323-330.
- O'Neal W.K, Zhou H., Morral N., Langston C., Parks R.J., Graham F.L., Kochanek S. y Beaudet A.L., (2000). Toxicity associated with repeated administration of first-generation adenovirus vectors does not occur with a helper-dependent vector. *Mol Med. Mar.* **6**: 179-195.
- Ozturk-Winder F., Renner M., Klein D., Muller M., Salmons B. y Gunzburg W.H., (2002). The murine whey acidic protein promoter directs expression to human mammary tumors after retroviral transduction. *Cancer Gene Ther.* **9**: 421-431.
- Paleyanda R.K., Velander W.H., Lee T.K., Scandella D.H., Gwazdauskas F.C., Knight J.W., Hoyer L.W., Drohan W.N. y Lubon H., (1997). Transgenic pigs produce functional human factor VIII in milk. *Nat. Biotechnol.* **15**: 971-975.
- Palomares L.A., Estrada-Mondaca S. y Ramírez O.T., (2004). Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *Methods Mol. Biol.* **267**: 15-52.
- Panda A.K., (2003). Bioprocessing of therapeutic proteins from the inclusion bodies of *Escherichia coli*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **85**: 43-93.
- Parks R.J., Chen L., Anton M. y Swat W., (1996). A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 13565-13570.
- Petrella J., Cohen C.J., Gaetz J. y Bergelson J.M., (2002). A zebrafish coxsackievirus and adenovirus receptor homologue interacts with coxsackie B virus and adenovirus. *J. Virol.* **76**: 10503-10506.
- Pfeifer A. y Verma I.M., (2001). Gene therapy: promises and problems. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **2**: 177-211.
- Pfeifer A., Ikawa M., Dayn Y. y Verma I.M., (2002). Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci.* **99**: 2140-2145.

- Pollock D.P., Kutzko J.P., Birck-Wilson E., Williams J.L., Echelard Y. y Meade H.M., (1999). Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies. *J. Immunol. Methods.* **231**:147-157.
- Porro D. y Mattanovich D., (2004). Recombinant protein production in yeasts. *Methods Mol. Biol.* **267**: 241-258.
- Pruijn G.J., Kusters H.G., Gmelig F.H. y van der Vliet P.C., (1986). Inhibition of adenovirus DNA replication in vitro by autoimmune sera. *Eur.J. Biochem.***154**: 363-370.
- Qin M., Chen S., Yu T., Escudero B., Sharma S. y Batra R.K., (2003). Coxsackievirus adenovirus receptor expression predicts the efficiency of adenoviral gene transfer into non-small cell lung cancer xenograft. *Clin Cancer Res.* **9**:4992-4999.
- Ramos A.S, Schmidt C.A., Andrade S.S., Fronza M., Rafferty B. y Dalmora S.L., (2003). Biological evaluation of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical products. *Brazilian J. of Med. and Biol. Research.***36**: 1561-1569.
- Rege A.B., Brookins J. y Fisher J.W., (1982). A radioimmunoassay for erythropoietin: serum levels in normal human subjects and patients with hemopoietic disorders. *J. Lab. Clin. Med.* **100**: 829-843.
- Ribatti D., Presta M., Vacca A. y Smith G.H., (1999). Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood.* **93**: 2627-2636.
- Ritter T., Lehmann M. y Volk H.D., (2002) Improvements in gene therapy: averting the immune response to adenoviral vectors. *BioDrugs.* **16**: 3-10.
- Rodríguez A., Castro F.O., Aguilar A., Ramos B., Del Barco D.G., Lleonart R. y De la Fuente J., (1995). Expression of active human erythropoietin in the mammary gland of lactating transgenic mice and rabbits. *Biol. Res.* **28**: 141-153.
- Romano M., (1995). Advances in the use of *Pichia pastoris* for the high-level gene expression. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**: 527-533.
- Rosenberger R.F., (1994). Translational errors during recombinant protein synthesis. *Dev. Biol. Stand.* **83**: 21-26.
- Roth J., (2002). Protein N-Glycosylation along the Secretory Pathway: Relationship to Organelle Topography and Function, Protein Quality Control, and Cell Interactions. *Chem. Rev.* **102**:285-303.
- Rudolph N.S., (1999). Biopharmaceutical production in transgenic livestock. *Trends Biotechnol.***17**: 367-374.



- Russell D.A., Spatola L.A., Dian T., Paradkar V.M., Dufield D.R., Carroll J.A. y Schlittler M.R., (2005). Host limits to accurate human growth hormone production in multiple plant systems. *Biotechnol. Bioeng.* **89**: 775-782.
- Russell T.D., Fischer A., Beeman N.E., Freed E.F., Neville M.C. y Schaack J., (2003). Transduction of the mammary epithelium with adenovirus vectors in vivo. *J. Virol.* **77**: 5801-5809.
- Russell W.C., (2000). Update on adenovirus and its vectors. *J. General Virol.* **10**: 1-63.
- Sambrook J., Fritsch E.F. y Maniatis T., (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, (eds). New York.
- Sato T., Furukawa K., Greenwalt D.E. y Kobata A., (1993). Most bovine milk fat globule membrane glycoproteins contain asparagine-linked sugar chains with GalNAc1-4GlcNAc groups. *J. Biochem.* **114**: 890-900.
- Sauthoff H., Pipiya T., Heitner S., Chen S., Norman R.G., Rom W.N. y Hay J.G., (2002). Late expression of p53 from a replicating adenovirus improves tumor cell killing and is more tumor cell specific than expression of the adenoviral death protein. *Hum. Gene Ther.* **13**: 1859-1871.
- Schagen F.H., Ossevoort M., Toes R.E. y Hoeben R.C., (2004). Immune responses against adenoviral vectors and their transgene products: a review of strategies for evasion. *Crit Rev Oncol Hematol.* **50**: 51-70.
- Schanbacher F.L. y Amstutz M.D., (1997). Direct transfection of mammary gland: Opportunities for modification of mammary function and the production, composition and qualities of milk. In: Welch, R.A.S., Burns, D.J.W., Davis, S.R., Popay, A.I. and Prosser, C.G. (Eds.), *Biotechnology in Agriculture Series, No 18. Milk Composition, Production, and Biotechnology*, CAB International, New York, NY pp 243-264.
- Schillberg S., Fischer R. y Emans N., (2003). Molecular farming of recombinant antibodies in plants. *Cell Mol. Life Sci.* **60**: 433-445.
- Scholler N., Hayden-Ledbetter M., Hellstrom K.E., Hellstrom I. y Ledbetter J.A., (2001). CD83 is a sialic acid-binding Ig-like lectin (Siglec) adhesion receptor that binds monocytes and a subset of activated CD8+ T cell. *J. Immunol.* **166**: 3865-3872.
- Semenza G.L., (1999). Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu. Rev. Cell Biol.* **15**: 551-578.
- Sharma R. y Schimke R.T., (1996). Preparation of electrocompetent *E. coli* using salt-free growth medium. *BioTechniques.* **20**: 42-44.
- Sharp J.M. y Doran P.M., (2001). Strategies for enhancing monoclonal antibody accumulation in plant cell and organ cultures. *Biotechnol Prog.* **17**: 979-992.

- Simmons L.C. y Yansura D.G., (1996). Translational level is a critical factor for the secretion of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* **14**: 629-634.
- Sinha N.D., Biernat J., Mcmanus J., y Koster H., (1983). Polymer supportoligonucleotide synthesis XVIII, use of cyanoethylN,N dialkyloamino N-morpholinophosphoramidite of deoxynucleosides for the syntesis of DNA fragments simplifying deprotection of the final product. *Nucleic Acids Res.* **12**: 4539-4557.
- Sobolev A.S., Rosenkranz A.A., Smirnova O.A., Nikitin V.A., Neugodova G.L., Naroditsky B.S., Shilov I.N., Shatski I.N. y Ernst L.K., (1998). Receptor-mediated transfection of murine and ovine mammary glands in vivo. *J. Biol. Chem.* **273**: 7928-7933.
- Spier R. y Kadouri A., (1997) The evolution of processes for the commercial exploitation of anchorage-dependent animal cells. *Enzyme Microb. Technol.* **21**: 2-8.
- Spivak J.L., (1992). The mechanism of action of erythropoietin: Erythroid cell response. En: J.W. Fisher (Ed.) *Biochemical Pharmacology of Blood and Blood-Forming Organs*. Springer-Verlag Berlin. Handbook of Experimental Pharmacology. pp 49-114.
- Srienc F., Campbell J.L. y Bailey J.E., (1986). Analysis of unstable recombinant *Saccharomyces cerevisiae* population growth in selective medium. *Biotechnol. Bioeng.* **28**: 996-1006.
- Stamenkovic I., Sgroi D. y Aruffo A., (1992). CD22 binds to  $\alpha$ 2,6-sialyltransferase-dependent epitopes on COS cells. *Cell.* **68**: 1003-1004.
- Stelwagen K., Farr V.C., Davis S.R. y Prosser C.G., (1995). EGTA-induced disruption of epithelial cell tight junctions in the lactating caprine mammary gland. *Am. J. Physiol.* **269**: 848-855.
- Stice S.L. y Rzucidlo S.J. (2001). Increasing cloning efficiencies requires a better understanding of developmental abnormalities and gene expression in manipulated embryos. *J. Anim. Sci.* **79**: 285-289.
- Stocklin E., Wissler M., Gouilleux F. y Groner B., (1996). Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor. *Nature.* **383**: 726-728.
- Stromqvist M., Houdebine L.M., Andersson J.O., Edlund A., Johansson T., Viglietta C., Puissant C. y Hansson L., (1997). Recombinant human extracellular superoxide dismutase produced in milk of transgenic rabbits. *Transgenic Res.* **6**: 271-278.
- Sudbery P.E., (1996). The expression of recombinant proteins in yeasts. *Curr. Opin. Biotechnol.* **7**: 517-524.



- Tai V.W. e Imperiali B., (2001). Substrate specificity of the glycosyl donor for oligosaccharyl transferase. *J. Org. Chem.* **66**: 6217-6228.
- Toledo JR, Sanchez O. (2005) Differential in vitro and in vivo glycosylation of human erythropoietin expressed in adenovirally transduced mouse mammary epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1726 (2005) **48** – 56
- Toledo JR., Sánchez O., Seguí RM., García G., (2006). High expression level of recombinant human erythropoietin in the milk of non-transgenic goats. *J Biotechnol.* **52** – 63
- Thomas J.G., Ayling A. y Baneyx F., (1997). Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. To fold or to refold. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **66**: 197-238.
- Thomson A.J., Marques M.M. y McWhir J., (2003). Gene targeting in livestock. *Reprod. Suppl.* **61**: 495-508.
- Tomko R.P., Xu R. y Philipson L., (1997). HCAR and MCAR: The human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and B coxsackievirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 3352-3356.
- Trimble R.B., Atkinson P.H., Tshopp J.F., Townsed R.R. y Maley F., (1991). Structure of oligosaccharide on *Saccharomyces SUC2* invertase secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Biol. Chem.* **266**: 22807-22817.
- Uchida H., Naito N., Asada N., Wada M., Ikeda M., Kobayashi H., Asanagi M., Mori K., Fujita Y., Konda K., Kusuvara N., Kamioka T., Nakashima K. y Honjo M., (1997). Secretion of authentic 20-kDa human growth hormone (20K hGH) in *Escherichia coli* and properties of the purified product. *J Biotechnol.* **55**: 101-112.
- Van Berkel P.H., Welling M.M., Geerts M., van Veen H.A., Ravensbergen B., Salaheddine M., Pauwels E.K., Pieper F., Nuijens J.H. y Nibbering P.H., (2002). Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows. *Nat. Biotechnol.* **20**: 484-487.
- Van Cott K.E., Butler S.P., Russell C.G., Subramanian A., Lubon H., Gwazdauskas F.C., Knight J., Drohan W.N. y Velander W.H., (1999). Transgenic pigs as bioreactors: a comparison of gamma-carboxylation of glutamic acid in recombinant human protein C and factor IX by the mammary gland. *Genet. Anal.* **15**: 155-160.
- Van Cott K.E., Lubon H., Gwazdauskas F.C., Knight J., Drohan W.N. y Velander W.H., (2001). Recombinant human protein C expression in the milk of transgenic pigs and the effect on endogenous milk immunoglobulin and transferrin levels. *Transgenic Res.* **10**: 43-51.

- Van Linthout S., Lusky M., Collen D. y De Geest B., (2002). Persistent hepatic expression of human apo A-I after transfer with a helper-virus independent adenoviral vector. *Gene Ther.* **9**: 1520-1528.
- Varki A., (1993). Biological role of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology.***3**: 97-130.
- Vincent W.F. e Imperiali B. (2001).Substrate Specificity of the Glycosyl Donor forOligosaccharyl Transferase. *J. Org. Chem.***66**: 6217-6228.
- Wall R.J., (1996) Transgenic livestock: progress and prospects for the future. *Theriogenology.* **45**: 57-68.
- Walsh G., (2003). Pharmaceutical biotechnology products approved within the European Union. Review. *Eur. J. Pharmac. and Biopharmac.***55**: 3-10.
- Walters R.W., Grunst T., Bergelson J.M., Finberg R.W., Welsh M.J. y Zabner J., (1999). Basolateral localization of fiber receptors limits adenovirus infection from the apical surface of airway epithelia. *J. Biol. Chem.* **274**: 10219-10226.
- Wasley L., Timmony G., (2013). The Importance of N- and O-Linked Oligosaccharides for the Biosynthesis and In Vitro and In Vivo Biologic Activities of Erythropoietin. *Blood-Journal.Hematology* 1991 77: 2624-2632
- Weber W., Rinderknecht M., Daoud-El Baba M., de Glutz F.N.,Aubel D. y Fussenegger M., (2004). CellMAC: a novel technology for encapsulation of mammalian cells in cellulose sulfate/pDADMAC capsules assembled on a transient alginate/Ca<sup>2+</sup> scaffold. *J. Biotechnol.* **114**: 315-326.
- Wegner G.H. y Harder W., (1986). Methylophilic yeast. *The Pichia yeast expression system*. Ed by Phillips petroleum company, Oklahoma, EEUU. pp 131-138.
- Weidle U.H., Lenz H. y Brem G., (1991). Genes encoding a mouse monoclonal antibody are expressed in transgenic mice, rabbits and pigs. *Gene.* **98**: 185-191.
- Wells K., Moore K. y Wall R., (1999). Transgene vectors go retro. *Nat. Biotech.* **17**: 25-26.
- Werner R.G., Noe W., Kopp K. y Schluter M., (1998). Appropriate mammalian expression systems for biopharmaceuticals. *Arzneimittelforschung.* **48**: 870-880.
- Wheeler M.B., (2003). Production of transgenic livestock: promise fulfilled. *J. Anim. Sci.* **81**: 32-37.
- Wilkinson D.L. y Harrison R.G., (1991). Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N. Y.).* **9**: 443-448.
- Winkelmann J.C., (1992). The human erythropoietin receptor. *Int. J. Cell Cloning.* **10**: 254-261.

- Wolf E., Schernthaner W., Zakhartchenko V., Prella K., Stojkovic M. y Brem G., (2000). Transgenic technology in farm animals progress and perspectives. *Exp Physiol.* **85**: 615-625.
- Writhg G., Carver A., Cottom D., Reeves D., Scott A., Simons P., Wilmut I., Garner I. y Colman A., (1991). High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Biotechnology.* **9**: 830-834.
- Wujek P., Kida E., Walus M., Wisniewski K.E. y Golabek A.A., (2004). N-glycosylation is crucial for folding, trafficking, and stability of human tripeptidyl-peptidase I. *J. Biol. Chem.* **279**: 12827-12839.
- Wurm F. y Bernard A., (1999). Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**: 156-159.
- Yang J., Tsukamoto T., Popnikolov N., Guzman R.C., Chen X., Yang J.H. y Nandi S., (1995). Adenoviral-mediated gene transfer into primary human and mouse mammary epithelial cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Lett.* **98**: 9-17.
- Yang Y., Nunes F.A., Berencsi K., Furth E.E., Gonczol E. y Wilson J.M., (1994). Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 4407-4411.
- Yang Y., Jooss K.U., Su Q., Ertl H.C. y Wilson J.M., (1996). Immune responses to viral antigens versus transgene product in the elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes *in vivo*. *Gene Ther.* **3**:137-144.
- Yolken R.H., Lawrence F., Leister F., Takiff H.E. y Strauss S.E., (1982). Gastroenteritis associated with enteric type adenovirus in hospitalized infants. *J Pediatr.* **101**:21-26.
- Yoon S.K., Choi S.L., Song J.Y. y Lee G.M., (2005). Effect of culture pH on erythropoietin production by Chinese hamster ovary cells grown in suspension at 32.5 and 37.0 degrees C. *Biotechnol. Bioeng.* **89**: 345-356.
- Yuen C.T., Gee C. y Jones C., (2002). High performance liquid chromatographic profiling of fluorescent labeled N-glycans on glycoproteins. *Biomed. Chromatogr.* **16**: 247-254.
- Yuen C.T., Storing P.L., Tiplady R.J., Izquierdo M., Wait R., Gee C.K., Gerson P., Lloyd P. y Cremata J.A., (2003). Relationships between the N-glycans structures and biological activities of recombinant human erythropoietins produced using different culture conditions and purification procedures. *J. Haematol.* **121**: 511-526.
- Zhang W. e Imperiale M.J., (2003). Requirement of the adenovirus IVa2 protein for virus assembly. *J. Virol.* **77**: 3586-3594.

Zhou Q., Kyazike J., Echelard Y., Meade H.M., Higgins E., Cole E.S. y Edmunds T., (2005). Effect of genetic background on glycosylation heterogeneity in human antithrombin produced in the mammary gland of transgenic goats. *J. Biotechnology*. **117**: 57-72.

