



Universidad
Nacional
de Córdoba



"Producción y purificación de Factor IX recombinante"

Córdoba, Argentina. 2018

HEMODERIVADOS
Laboratorio Farmacéutico UNC
CIQIBIC-CONICET
CIBICI-CONICET

Lic. en Biotec. Hugo Daniel Martínez
Director: Dr. Carlos E. Argaraña
Co-Directora: Mgtr. M. Susana Vitali

Parte de los resultados del presente trabajo de Tesis fueron presentados en:

- El IV Simposio de Procesos Biotecnológicos (SAPROBIO), en modalidad disertación y póster: “Producción de FIX humano recombinante (FIXr) en células de mamífero”. Martinez HD, Arias CI, Corona ED, Argaraña CE, Bocco JL, Daniotti JL, Vitali MS, Massa C. Centro Metropolitano de diseño. Buenos Aires, Argentina (2016).
- Las VII Jornadas de Posgrado y I Jornada de Ciencia y Tecnología, en modalidad póster: “Purificación cromatográfica de Factor IX recombinante”. Martinez, HD, Arias CI, Corona DE, Argaraña CE, Bocco JL, Daniotti JL, Massa C, Moya C, Vitali S. Facultad de Ciencias Químicas UNC. Córdoba, Argentina. (2016).

A las personas más importantes en mi vida,

Olga, Marcos y Mara

AGRADECIMIENTOS

Por dónde empezar...

Quisiera agradecer a quien me eligió para trabajar a su lado, mi jefa y co-directora de Tesis Susana Vitali, dándome la posibilidad de formar parte de un excelente grupo de personas dentro de un laboratorio ejemplo en el País.

A mi director de Tesis, Carlos Argaraña y asesor del Proyecto BIOHEMO, quien junto a Susi me guió y brindó sus conocimientos durante el desarrollo y escritura del presente trabajo.

A mis compañeros del Área de Desarrollo de Productos y Procesos de Hemoderivados Laboratorio Farmacéutico: Adri, Ani, Cris, Dani, Euge, Fede, Gonza, Marce, Noe, Pelado, Ricky y Romi. Excelentes profesionales y compañeros.

Agradezco mucho a mis compañeros del laboratorio de Biotecnología Cristina Arias y Daniel Corona, cuya colaboración y trabajo fue fundamental durante todo el desarrollo del presente trabajo de Tesis y de quienes recibí un gran aporte en conocimientos teóricos y técnicos.

También quisiera agradecer a los demás asesores del proyecto BIOHEMO José Bocco y José Daniotti, como así también a la Directora del mismo Catalina Massa y la colaboración de Cristian Un gran agradecimiento a Hemoderivados Laboratorio Farmacéutico y a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba por generar los convenios interinstitucionales necesarios para cumplir los objetivos de este trabajo.

Mi mayor agradecimiento a mis queridos viejos que siempre me apoyaron y sacrificaron todo, hasta en los momentos más difíciles, para que pueda lograr mi realización tanto personal como profesional. Siempre a mi lado sin importar la distancia.

Finalmente, el más íntimo agradecimiento a mi amor y compañera de vida quien fue mi gran sostén brindándome toda su paciencia y fuerza en los momentos más complicados y la cual constituye día a día mi fuerza espiritual.

ÍNDICE

1	LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	I
2	RESUMEN	III
3	ABSTRACT.....	V
4	INTRODUCCIÓN.....	1
4.1	LA HEMOFILIA	1
4.2	COAGULACIÓN	2
4.3	FIX.....	3
4.4	PACE	6
4.5	CÉLULAS DE MAMÍFERO UTILIZADAS COMO PLATAFORMA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOFÁRMACOS	8
4.6	ETAPAS DE UN PROCESO PRODUCTIVO DE BIOFÁRMACOS UTILIZANDO CÉLULAS CHO.....	11
5	OBJETIVOS.....	14
5.1	OBJETIVO GENERAL.....	14
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
6	MATERIALES Y MÉTODOS	15
6.1	LÍNEAS CELULARES	15
6.2	MEDIOS DE CULTIVO	15
6.2.1	Medios de cultivo para células CHO/DHFR ^r	15
6.3	MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS DE CÉLULAS CHO/DHFR ^r	16
6.3.1	Determinación de la concentración de células totales y viabilidad celular.....	17
6.3.2	Criopreservación.....	17
6.4	DISEÑO Y OBTENCIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN	18

6.4.1	Diseño de vectores de expresión.....	18
6.4.2	Transformación de bacterias y preparación de ADN plasmídico.....	23
6.4.3	Purificación de ADN a partir de geles de agarosa.....	23
6.4.4	Digestiones enzimáticas.....	24
6.4.5	Reacción de ligación de ADN.....	24
6.5	TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS EUCARIOTAS	24
6.5.1	Transfecciones transientes.....	24
6.5.2	Transfecciones estables.....	25
6.6	CLONADO CELULAR.....	26
6.6.1	Clonado celular utilizando cilindros de clonado.....	26
6.6.2	Clonado celular utilizando el método de dilución límite.....	27
6.7	AMPLIFICACIÓN GÉNICA	27
6.8	ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	28
6.9	DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES.....	29
6.10	ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (PAGE) Y WESTERN BLOT.....	29
6.11	PURIFICACIÓN CROMATOGRÁFICA DE FIXr.....	29
6.11.1	Evaluación de las condiciones de lavado y elución cromatográfica.....	30
6.11.2	Purificación del FIXr producido por un clon celular estable.....	33
6.11.3	Parámetros evaluadores de la eficiencia de la purificación cromatográfica de FIXr.....	34
6.12	FÁRMACO DE REFERENCIA	34
6.13	RESUMEN EXPERIMENTAL.....	35
7	RESULTADOS	36
7.1	DISEÑO Y OBTENCIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN	36

7.1.1	Diseño de vectores de expresión.....	36
7.2	TRANSFECCIÓN Y EXPRESIÓN DE FIXr	37
7.2.1	Evaluación de la expresión de FIXr en células transfectadas de forma transiente.....	37
7.2.2	Obtención y selección de clones celulares estables.....	37
7.3	AMPLIFICACIÓN GÉNICA	39
7.4	PURIFICACIÓN CROMATOGRÁFICA DE FIXr	42
8	CONCLUSIONES	52
9	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1 LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AB: actividad biológica

AE: actividad específica

APTT-P: tiempo parcial de tromboplastina activada

ASH: albúmina sérica humana

CHO: Ovario de Hámster Chino

CHO/DHFR⁻: CHO deficientes en la enzima dihidrofolatoreductasa

CTP: concentración de proteínas totales

DE: desviación estándar

DHFR: dihidrofolatoreductasa

DMSO: dimetilsulfóxido

EGF-1: Factor de crecimiento epidérmico 1

EGF-2: Factor de crecimiento epidérmico 2

EPO: eritropoyetina

F: factor de la coagulación [distintos factores se designan por números romanos]

FIXp: Factor IX plasmático de la coagulación

FIXr: Factor IX recombinante de la coagulación

Fa: factor de la coagulación activado

FDA: *Federation Drugs Administration*

FP: factor de purificación

GLA: dominio γ -carboxiglutámico

HMWK: Cininógeno de alto peso molecular

IFN- β : interferon beta

MCS: sitio de múltiple clonado

MTX: metotrexato

mUA: miliunidades de absorbancia

Neo^r: resistencia a la neomicina

PACE: *Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme*

PACE SOL: *Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme Soluble*

PCMV: citomegalovirus

PK: Precalicerina

PL: Fosfolípidos de membrana plaquetaria

RE: retículoendoplasmático

R %: Rendimiento porcentual

SFB: Suero Fetal Bovino

SFBd: Suero Fetal Bovino dializado

TF: Factor Tisular

TF-FVIIa: complejo conformado entre el Factor Tisular y el Factor VII de la coagulación activado

THF: tetrahidrofolato

t-PA: activador tisular del plasminógeno

UIt: unidades totales

α : cadena ligera o liviana

β : cadena pesada

2 RESUMEN

La hemofilia B es una enfermedad hereditaria caracterizada por hemorragias espontáneas o prolongadas debidas a la ausencia o pérdida de actividad de una proteína presente en la sangre, el Factor IX de la coagulación humano (FIX), cuya función principal es promover mediante una reacción en cascada, la formación del coágulo.

El tratamiento preventivo de esta patología se basa en la administración de concentrados de FIX por vía endovenosa, tradicionalmente de origen plasmático humano, por lo que existe limitación de disponibilidad de volúmenes importantes de materia prima para su producción a niveles industriales, y al mismo tiempo conlleva un riesgo inherente de contaminación biológica a pesar de tratarse de sangre proveniente de donantes sanos.

El cultivo de células para la producción de proteínas recombinantes de tercera generación elimina el riesgo de transmisión de agentes infecciosos ya que las células que lo producen se cultivan en ausencia de proteínas de origen humano o animal, constituyendo además una plataforma para su producción en masa sin limitación de materia prima.

El objetivo del presente trabajo de Tesis es la expresión y purificación de FIX humano recombinante (FIXr) utilizando como plataforma productiva células de Ovario de Hámster Chino (CHO).

En una primera etapa se utilizaron herramientas bioinformáticas que permitieron el diseño de los distintos vectores para la expresión de FIXr, una vez verificada su factibilidad se utilizó la técnica de PCR para obtener uno de ellos.

Luego se transfectaron células CHO deficientes en la enzima dihidrofolato reductasa (CHO/DHFR⁻), las cuales facilitaron, empleando medios de cultivos de selección, tanto la generación y selección de líneas celulares estables productoras de FIXr, como la posterior amplificación génica del FIXr empleando como inductor de la amplificación metotrexato (MTX). Finalmente se realizó una nueva etapa de selección clonal de las líneas celulares más productoras obteniéndose clones celulares estables productores de FIXr con una actividad biológica promedio de 1 UI.mL⁻¹.

A su vez se desarrolló un proceso de purificación cromatográfica de FIXr a partir de sobrenadantes de cultivos celulares en adhesión. Para ello se utilizó una matriz de intercambio aniónico fuerte empleando una estrategia de purificación selectiva para la forma correctamente γ -carboxilada de FIXr logrando un rendimiento de actividad biológica de FIXr superior al 90% y un factor de purificación elevado (FP: 128,9).

El presente trabajo de Tesis forma parte un ambicioso proyecto realizado en conjunto entre Hemoderivados Laboratorio Farmacéutico UNC y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) de la FCQ-UNC (Proyecto BIOHEMO)* cuyo objetivo es generar una instancia de innovación y desarrollo para la producción de factores de la coagulación obtenidos por tecnología de ADN recombinante.

En la actualidad no existe producción nacional de FIXr y la disponibilidad de este medicamento permitirá incrementar a futuro medicamentos esenciales para pacientes que padecen hemofilia B y generar el desarrollo de capacidades y tecnología para la producción de otras proteínas de uso médico a nivel nacional y regional.

A nivel mundial el uso de medicamentos recombinantes se ha incrementado considerablemente debido a las ventajas cuali-cuantitativas que de ellos se obtienen, una es la producción en masa de las proteínas y otra la seguridad biológica en términos de transmisión de enfermedades infecto contagiosas potencialmente presente en los derivados de origen plasmático.

*Integrantes del Proyecto BIOHEMO: Dr. Argaraña Carlos¹; Dra. Arias Cristina²; Dr. Bocco Jose³; Dr. Corona Daniel²; Dr. Daniotti Jose¹; Lic. en Biotec. Martinez Daniel²; Mgtr. Masa Catalina²; Mgtr. Vitali Susana²; ¹CIQUIBIC-FCQ; ²Hemoderivados Laboratorio Farmacéutico; ³CIBICI-FCQ.

ABSTRACT

Hemophilia B is an inherited disorder characterized by spontaneous or prolonged hemorrhages due to deficiency or dysfunction of the Factor IX human (FIX). FIX is a blood protein whose main function is to promote the clot formation by a cascade reaction.

Traditionally, the preventive treatment of this pathology is based on frequent intravenous infusions of human plasmatic concentrated FIX from healthy donors. Thus, FIX availability is limited and there are biological contamination risks.

The cell culture to produce third generation recombinant proteins reduces the possible infectious transmission agents since they are grown in absence of human or animal proteins. Furthermore, these platforms enhance the protein mass scale production.

The aim of the present work is the expression and purification of recombinant human FIX (FIXr) using Chinese Hamster Ovary (CHO) cells as productive platform.

In a first stage, bioinformatics tools were used to design the different vectors for the FIXr expression. Once their feasibility was verified, the PCR technique was used to obtain one of them.

CHO cells used in this work are enzyme dihydrofolate reductase (CHO/DHFR⁻) deficient. These cells were transfected in order to generate and select cell stable lines that express FIXr. Then, methotrexate (MTX) was used as a FIXr amplification gene. Finally, an average biological activity of 1 IU.mL⁻¹ was obtained by a clonal selection of the most productive cell lines.

Additionally, a strong anion exchange matrix was used to develop FIXr chromatographic purification method. This method is based on select the correct γ -carboxylated form of FIXr. Purification factor (PF) value obtained was 128.9. FIXr biological activity recovery values were higher than 90%.

This work is part of an ambitious project carried out between Hemoderivados Laboratorio Farmacéutico UNC and the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) of the FCQ-UNC (BIOHEMO Project)*. The goal project is to generate an instance of innovation and development of coagulation factors production obtained by recombinant DNA technology.

Unfortunately, there is not FIXr national production. But, recombinant DNA techniques would improve the availability and quality patients life at national and regional level.

Globally, the use of recombinant drugs has increased due to the amount of protein production and the biological safety from potential infectious contaminants of plasma-derived clotting factors.

* Members of the BIOHEMO Project: Dr. Argaraña Carlos¹; Dra. Arias Cristina²; Dr. Bocco Jose³; Dr. Corona Daniel²; Dr. Daniotti Jose¹; Lic. en Biotec. Martinez Daniel²; Mgtr. Masa Catalina²; Mgtr. Vitali Susana²; ¹CIQUIBIC-FCQ; ²HemoderivadosLaboratorio Farmacéutico; ³CIBICI-FCQ.

3 INTRODUCCIÓN

3.1 LA HEMOFILIA

La hemofilia se define como un trastorno congénito o adquirido de la coagulación que generalmente implica una deficiencia cuantitativa y/o funcional de una proteína plasmática de la coagulación. Las dos formas más comunes de son la hemofilia A y la hemofilia B, causados por mutaciones recesivas ligadas al cromosoma X que dan como resultado la deficiencia del factor VIII (FVIII) o factor IX (FIX) de la coagulación, respectivamente (Schaub 2011; Stonebraker et al. 2011; Louise C. Wasley et al. 1993). El fenotipo hemorrágico de la Hemofilia típicamente se clasifica de acuerdo con los niveles de FVIII y FIX residual; y se define como grave cuando el porcentaje residual de estos factores es menor al 1% causando sangrado espontáneo en articulaciones o músculos, predominantemente en ausencia de desafío hemostático identificable; moderada cuando el porcentaje residual se encuentra entre 1 y 5 % provocando sangrado prolongado con trauma menor o cirugía y sangrado espontáneo ocasional; o leve cuando el porcentaje residual es del 5 al 40% lo cual causa sangrado severo con trauma mayor o cirugía, el sangrado espontáneo es raro (Cancio et al. 2013; Dolan et al. 2017; Franchini 2014; Goodeve 2015; Srivastava et al. 2013).

La hemofilia ocurre en uno de cada 10000 nacimientos y de éstos, el 80 % corresponde a hemofilia A y el 20% a la hemofilia B. Las estimaciones basadas en las encuestas mundiales anuales de la Federación Mundial de la Salud indican que el número de personas con hemofilia en el mundo es de aproximadamente 400000 (Srivastava et al. 2013).

La base del tratamiento de la hemofilia B consiste en la terapia de reemplazo con concentrados de FIX de origen plasmático (FIXp) o recombinante (FIXr), estos se obtienen en la industria farmacéutica mediante la purificación del plasma de donantes de sangre y a través de técnicas de biología molecular, respectivamente. La primera metodología tiene como limitación la disponibilidad de volúmenes importantes de plasma humano y que a pesar de tratarse de sangre proveniente de donantes sanos, existe el riesgo potencial de contaminación biológica, especialmente de agentes infecciosos de origen viral. En cambio la tecnología de tercera generación que emplea células para la obtención de proteínas recombinantes reduce el riesgo

ya que estas son sintetizadas en células cultivadas en ausencia de proteínas de origen humano o animal (Demain and Vaishnav 2009; Roth et al. 2001).

3.2 COAGULACIÓN

El proceso de coagulación implica complejas interacciones bioquímicas y celulares que se producen en forma de cascada, donde intervienen varias proteínas a través de dos vías, la vía intrínseca y la vía extrínseca (Fig. 1).

La vía extrínseca se inicia en el sitio de la lesión en respuesta a la liberación del factor tisular (TF). Este es un cofactor en la activación catalizada por factor VII activado (FVIIa) del factor X (FX).

La vía intrínseca se inicia cuando la precalicreína (PK), el cininógeno de alto peso molecular (HMWK), el factor XI (FXI) y el factor XII (FXII) se exponen a una superficie cargada negativamente. Esto se denomina fase de contacto y puede ocurrir como resultado de la interacción con los fosfolípidos de partículas de lipoproteínas circulantes. El ensamblaje de los componentes de la fase de contacto da como resultado la conversión de PK a calicreína, que a su vez activa el FXII (FXIIa). El FXIIa luego activa el FXI (FXIa). En presencia de iones Ca^{+2} , el FXIa cliva al FIX activándolo (FIXa). Luego de lo cual se ensambla un complejo conformado por iones Ca^{+2} , FIXa, FVIII activado (FVIIIa) y factor X (FX), en el que el FIXa es el encargado de clivar al FX en una unión interna de Arginina-Isoleucina resultando en la activación de este último (FXa), todo esto ocurre en presencia de fosfolípidos de membrana plaquetaria (PL). En este punto convergen las dos vías de la cascada de coagulación. Finalmente, el FXa activa a la protrombina (Factor II) convirtiéndolo en trombina (Factor IIa), la cual convierte el fibrinógeno en fibrina, a través del complejo protrombinasa para conformarse así el coagulo de fibrina (King 1996).

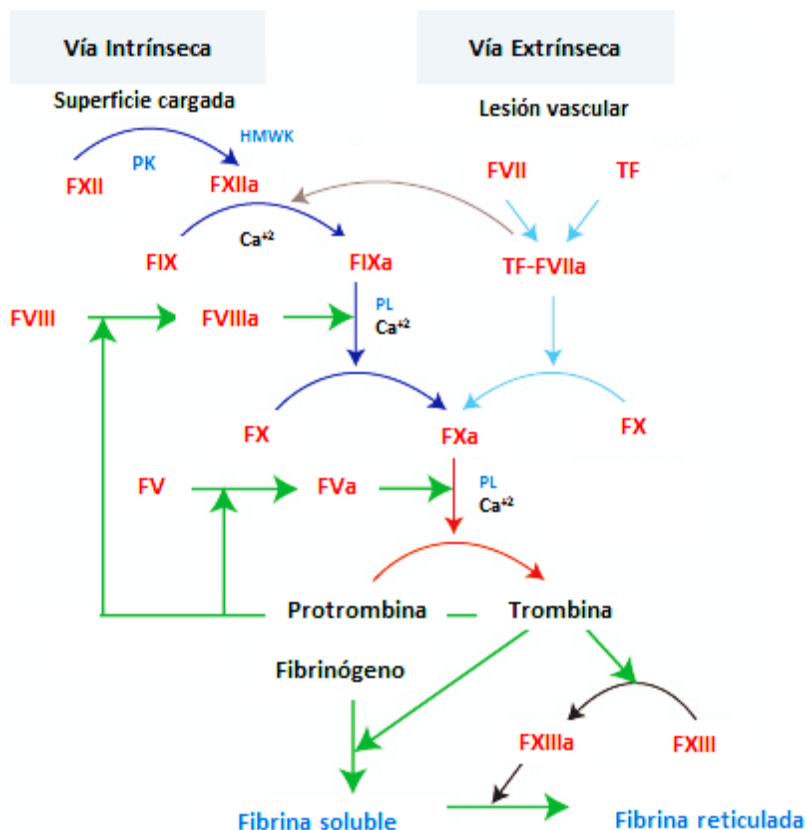


Figura 1: Cascada de la coagulación sanguínea.

3.3 FIX

El FIX se sintetiza en el hígado como un polipéptido de 461 aminoácidos (aa), a medida que se va traduciendo, en el retículo endoplasmático (RE) se adicionan oligosacáridos de alta manosa a los residuos de aspártico. Luego de la acción de peptidasas se elimina el péptido señal, de 28 aa (Fig. 2), permitiendo que el FIX se traslade hacia el aparato de Golgi, donde sufre numerosas modificaciones post-traduccionales, muchas de las cuales son esenciales para su actividad biológica, entre ellas encontramos la remodelación de los N-oligosacáridos que contiene, adición de hidratos de carbono a los residuos de serina/treonina, hidroxilación de un residuo de ácido aspártico, fosforilación de una serina, sulfatación de una tirosina en el dominio de activación y γ -carboxilación dependiente de vitamina K de residuos de ácido glutámico (factor de la coagulación vitamina K-dependiente). Finalmente, se cliva el propéptido de 18 aa, por acción de la proteasa denominada PACE (Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme), necesaria

para la correcta secreción del FIX al espacio extracelular, obteniéndose una proteína madura (Hansson and Stenflo 2005; Randal J. Kaufman 1998; Liu, Jonebring, Hagström, et al. 2014; White et al. 1998). Estas modificaciones hacen que el peso molecular teórico de la proteína (46,5 kDa) difiera del determinado experimentalmente, el cual se encuentra entre 55-71 kDa (Liu, Jonebring, Hagström, et al. 2014).

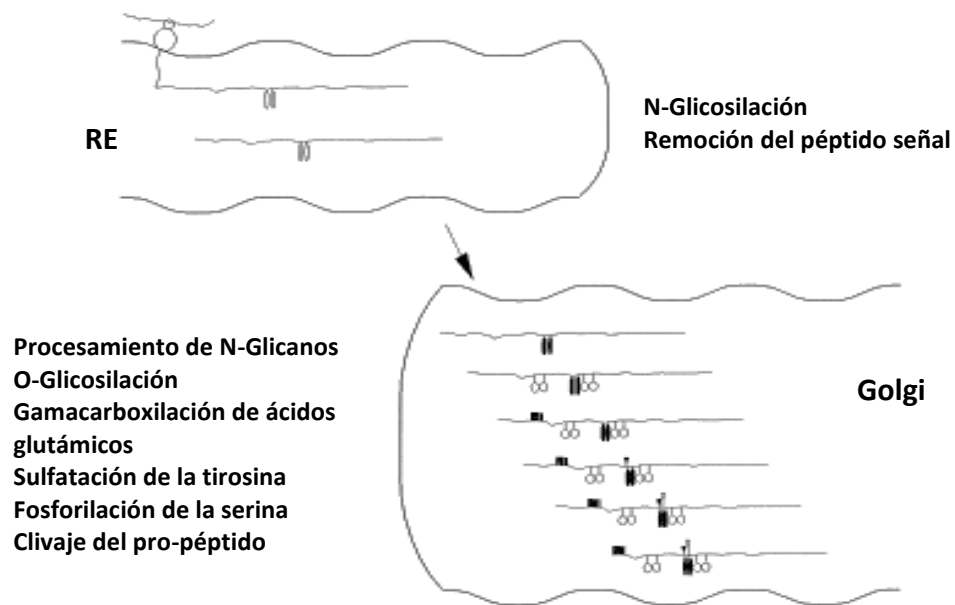


Figura 2: Modificaciones post-traduccionales del FIX. Tomado de (White et al. 1998).

El FIX maduro es una glicoproteína de 415 aa de cadena única, posee 12 residuos γ -carboxiglutámico (GLA) en la región amino-terminal, estos facilitan la fijación dependiente de calcio del FIXa a los fosfolípidos de carga negativa. Esta proteína posee además, dos dominios homólogos al factor de crecimiento epidérmico (EGF-1 y EGF-2), los cuales abarcan la región entre el dominio GLA y el péptido clivado durante su activación (desde Ala-146 hasta Arg-180). Finalmente presenta una región serina proteasa en la porción carboxi-terminal (con la triada catalítica: Ser-365, His-221, Asp-269) (Kaufman 1998; Rehemtulla and Kaufman 1992b). La activación del FIX se produce por acción del FXIa, primero se cliva el FIX en la Arg-145, formando el FIX intermedio, y luego ocurre una escisión en la Arg-180, dando como resultado la forma totalmente activa (forma IX α β). La cadena ligera (α) correspondiente a la región amino-terminal

(dominios GLA y 2 EGF) permanece unida covalentemente a la cadena pesada (β) de la región carboxi-terminal por un puente disulfuro (Fig. 3, 4 y 5) (Hansson and Stenflo 2005).

```

-46                -19                1
MQRVNMIMAESPLI TICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLERECMEEKCS
FEFAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCCKDDINSYECWCPFGFEGKNCEL DVTCNINKGR
CEQFCKNASADNKVVCSCTEGYRIAENQKSCEPAVPPFCGRVSVSQTSKLTAEAVFPDVDYVNSTEAE TI
LDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDADF CGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVWAG
EHNIEETEHETEQKRNVIRI I PHHNYNAA INKYNHDI ALLELDE PLVLNSYVTP I CIADKEYTNI FLKFGS
GYVSGWGRV FHKGRSALV LQYLRVPLVDRATCLRSTKFT IYNNMFCAGFHEGGRDSCQGD SGGPHVTEVE
GTSFLTGII SWGEECAMKGYGIYTKVSRVYVNWIKETKLT
    
```

Figura 3: Secuencia de aminoácidos del FIX humano, isoforma Alanina 148 (A148). Se muestra: péptido señal (-19 a -46) y propéptido (-18 a -1), también se observan la cadena liviana α (1 a 145), la cadena pesada β (180 a 415), el péptido liberado luego de la activación (145 a 180), las cisteínas que forman un puente disulfuro entre la cadena α y la β (C132 y C289) y los sitios de clivaje por el FXIa R145-A146 y R180-V181 y A148.

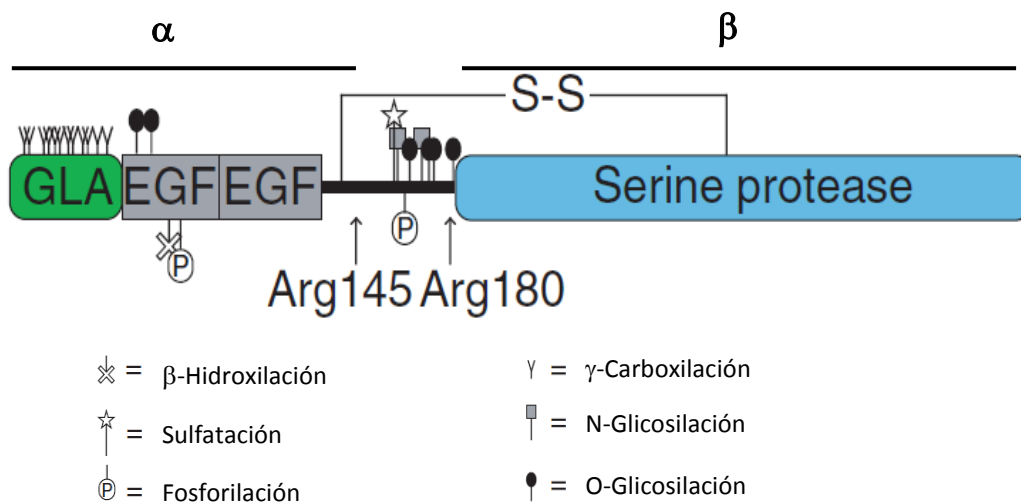


Figura 4: Representación lineal de los dominios estructurales y sus modificaciones post-traduccionales del FIX.

Tomado y modificado de (Hansson and Stenflo 2005).

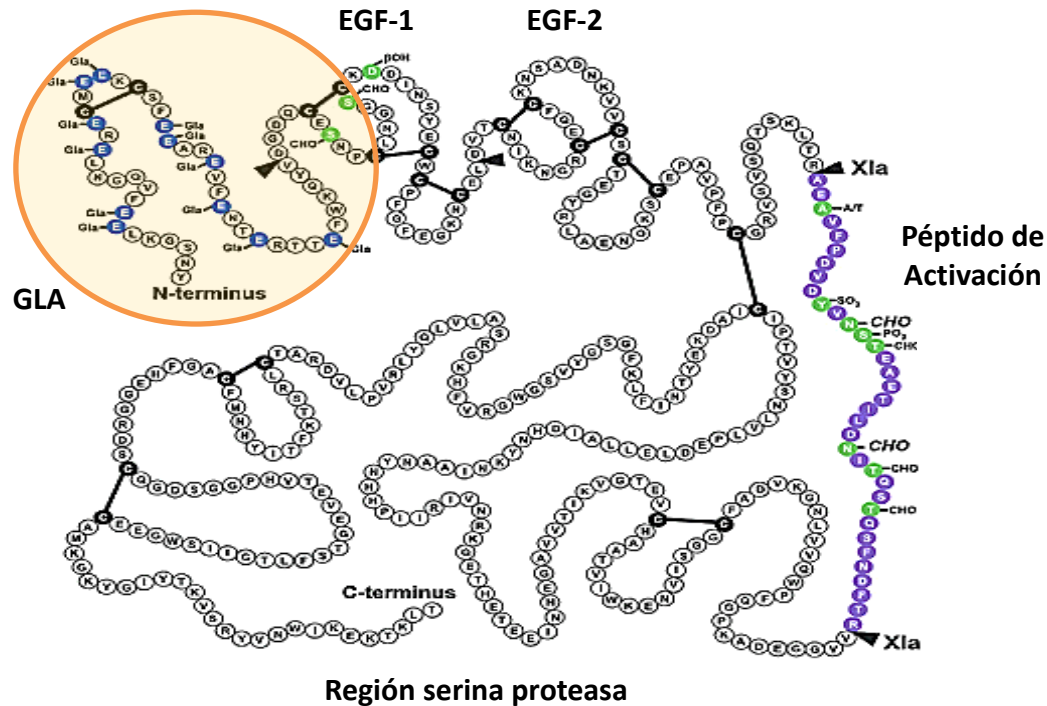


Figura 5: Secuencia primaria de aminoácidos de FIX con sus dominios funcionales. Dentro del círculo naranja se señala el dominio GLA y los 12 residuos de ácido glutámico gamacarboxilado (azul). Tomado y modificado de (Desai 2015).

3.4 PACE

La enzima endoproteolítica dibásica denominada PACE, inicialmente era conocida por el nombre de Furina, esta es una proteína convertasa del tipo subtilisina, correspondiente a la familia de las serina proteasas implicadas en el procesamiento endoproteolítico de la vía secretora. Estas proteasas poseen un péptido señal, un propéptido aminoterminal (el cual se elimina autocatalíticamente en el Golgi), un dominio catalítico tipo subtilisina, una región rica en cisteína, un dominio transmembrana tipo I implicado en el anclaje a la superficie celular y un dominio citoplasmático de longitud variable (Fig. 6). La PACE reconoce motivos consensos dibásicos Arginina-X-Lisina/Arginina-Arginina e hidrolizan el enlace peptídico al final de estos motivos en el extremo C-terminal (Hansson and Stenflo 2005; Rehemtulla and Kaufman 1992b).

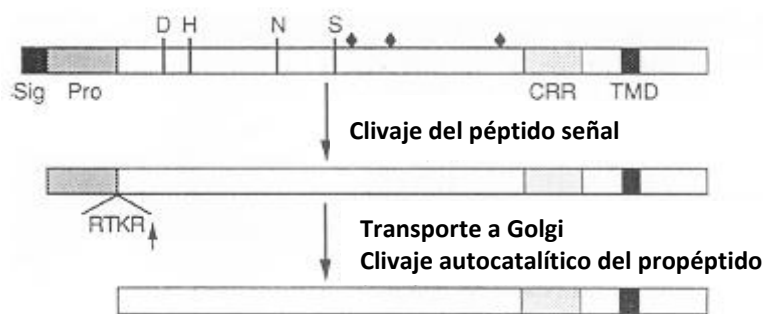


Figura 6: Representación esquemática de PACE y su maduración intracelular. Sig: péptido señal; Pro: propéptido; CRR: región rica en cisteína; TMD: dominio transmembrana; D, H, N y S: residuos de ácido aspártico, histidina, asparagina y serina (involucrados en la actividad catalítica); diamantes: sitios de potencial N-glicosilación. El sitio de clivaje se señala con una flecha. Tomado de (Rehemtulla, Dorner, and Kaufman 1992).

La sobre-expresión de pro-proteínas, en los sistemas de expresión de células eucariotas, como los factores de coagulación humanos vitamina K-dependiente, requieren la expresión simultánea de PACE para que ocurra el clivaje del propéptido y producir proteínas completamente procesadas (R. J. Kaufman 1998; Rehemtulla et al. 1992; Louise C. Wasley et al. 1993).

PACE no posee actividad funcional en el retículo endoplasmático, ya que es necesario para ello la escisión autocatalítica del propéptido, la cual ocurre en el Golgi. Tanto el dominio transmembrana como la cola citoplasmática de PACE no son requeridos para su actividad funcional pero sí desempeñan un papel importante en la localización de la enzima en Golgi, para demostrar lo anterior se construyó una forma mutante de la proteína (PACE Sol), la cual carece de los residuos 716-794 (Rehemtulla et al. 1992; Wise et al. 1990).

La mutante soluble de PACE posee un tránsito intracelular más lento que la enzima nativa, haciendo más eficiente el procesamiento proteolítico de factores dependientes de vitamina K, a su vez dicha enzima continúa con su actividad enzimática en el medio extracelular, aumentando así su capacidad de procesamiento. Existen antecedentes del uso de la mutante soluble de PACE para mejorar el procesamiento de factores de coagulación recombinantes como el FvW y el FIX (Rehemtulla et al. 1992; Louise C. Wasley et al. 1993).

3.5 CÉLULAS DE MAMÍFERO UTILIZADAS COMO PLATAFORMA PARA LA PRODUCCIÓN DE BIOFÁRMACOS

Diferentes líneas celulares derivadas de humanos o roedores como 3T3, CHO, BHK, HeLa y HepG2 se han utilizado frecuentemente en la investigación biomédica para la expresión de proteínas recombinantes. A pesar de la disponibilidad absoluta de dichas líneas celulares, casi el 70 % de todos los productos terapéuticos de proteínas recombinantes que se producen hoy en día se fabrican en células de ovario de hámster chino (CHO) (Jayapal et al. 2007), tales como el FVIII y el FIX, el interferon beta (IFN- β), la eritropoyetina (EPO), la desoxiribonucleasa I (DNAsa I), el activador tisular del plasminógeno (t-PA), entre otras proteínas (Chu and Robinson 2001; Jayapal et al. 2007; White et al. 1998). Las ventas anuales al año 2007 de productos biológicos producidos con células CHO superan los U\$S 30 mil millones en todo el mundo (Jayapal et al. 2007).

Tabla 1: Lista de productos Biofarmacéuticos producidos en células CHO aprobados por la FDA (*Federation Drugs Administration*) al año 2006. Tomado y modificado de (Jayapal et al. 2007).

Producto	Tipo	Uso terapéutico	Empresa	Año de aprobación (FDA)
Vectibix	Anti-EGFR mAb	Cancer colorectal metastásico	Amgen	2006
Myozyme	α -glucosidasa	Enfermedad de pompe	Genzyme	2006
Aldurazyme	Laronidasa	Mucopolisacaridosis I	Genzyme	2006
Orencia	Fusión Ig-CTLA4	Artritis reumatoide	Bristol-Myers Squibb	2005
Naglazyme	N-acetilgalactosamina-4-sulfatasa	Mucopolisacaridosis VI	BioMarin Pharmaceutical	2005
Luveris	Hormona Luteinizante	Infertilidad	Senoro	2004
Avastin	Acm Anti-VEGF	Cancer colorectal metastático y cáncer de pulmón	Genentech	2004
Advate	Factor VIII	Hemofilia A	Baxter	2003
Xolair	Acm Anti-IgE	Asma moderada/severa	Genentech	2003
Fabrazyme	α -galactosidasa	Enfermedad de Fabry	Genzyme	2003
Rebif	Interfero- β	Esclerosis múltiple recurrente	Serono	2002
Humira	Acm Anti-TNF α	Artritis rematoidea	Abbott	2002

Aranesp	Eritropoyetina	Anemia	Amgen	2001
Campath	Acm Anti-CD52	Leucemia linfocítica crónica	Genzyme, Bayer	2001
Refacto	Factor VIII	Hemofilia A	Wyeth	2000
Tenecteplase	Activador tisular del plasminógeno	Infección del miocardio	Genentech	2000
Herceptin	Acm Anti-HER2	Cancer metastásico de mama	Genentech	1998
Enbrel	Proteína de fusión Receptor del TNF α	Artritis reumatoide	Amgen, Wyeth	1998
BeneFIX	Factor IX	Hemofilia B	Wyeth	1997
Follistim/Gonal-F	Hormona folículo estimulante	Infertilidad	Serono/NV Organon	1997
Avonex	Interferon- β	Esclerosis múltiple recurrente	Biogen Idec	1996
Cerezyme	β -glucocerebrosidasa	Enfermedad de Gaucher's	Genzyme	1994
Pulmozyme	Desoxirribonucleasa I	Fibrosis quística	Genentech	1993
Epoogen/Procrit	Eritropoyetina	Anemia	Amgen/Ortho Biotech	1989
Activase	Activador tisular del plasminógeno	Infección aguda del miocardio	Genentech	1987

La producción de biofármacos en células CHO se ha convertido en una de las principales áreas de la biotecnología moderna y sobre todo en lo que respecta a salud humana, gracias a su habilidad de realizar complejas modificaciones pos-traduccionales.

En este sentido la función de muchas glicoproteínas se encuentra estrechamente relacionada con la presencia y composición de sus cadenas de hidratos de carbono.

Las células CHO poseen una maquinaria enzimática que les permite secretar proteínas recombinantes con una glicosilación similar a la humana (Chu and Robinson 2001; Jayapal et al. 2007; Jenkins and Curling 1994; Kaufman et al. 1985; Lee, Rothb, and Tii 1989; Zhu 2012), lo que las convierte en hospederas ideales para la expresión de glicoproteínas.

Las células CHO están muy bien caracterizadas, son relativamente estables, permiten expresar proteínas heterólogas en altos niveles y pueden crecer en cultivo tanto adheridas a una superficie como en suspensión.

Un estudio realizado en el año 1989 encontró que de 44 virus patógenos humanos probados (incluidos el VIH, la gripe, la poliomielitis, el herpes y el sarampión), la gran mayoría de ellos no se replican en las células CHO (Wiebe, et al. 1989). Desde un punto de vista regulatorio, las células CHO han resistido distintas pruebas a través del tiempo, esto junto a los datos de seguridad acumulados durante décadas de producción comercial indudablemente facilitan el proceso para lograr la aprobación por parte de las agencias reguladoras de diferentes proteínas recombinantes producidas en estos sistema de expresión (Jayapal et al. 2007).

Las células CHO fueron cultivadas por primera vez en 1958 (Puck 1958), a partir de la biopsia de un ovario de una hembra de hámster chino. A partir de estas células CHO originales se han clonado sub-líneas con diferentes mutaciones. Estas mutantes exhiben requisitos nutricionales particulares para mantener el crecimiento y su viabilidad durante largos períodos de cultivo. De esta forma se aislaron mutantes con diferentes grados de deficiencias en las enzimas metabólicas, como por ejemplo la dihidrofolato reductasa (DHFR) (Urlaub and Chasin 1980). La DHFR es una pequeña enzima monomérica que cataliza la conversión del ácido fólico en tetrahidrofolato (THF), un cofactor requerido para la síntesis de glicina, purina y timidina. De esta manera y teniendo en cuenta que las células deficientes en DHFR son auxótrofos triples para glicina, hipoxantina (un derivado de la purina) y timidina, la introducción de genes heterólogos en dichas células se puede lograr transfectando en el mismo vector o en otro vector una copia funcional del gen DHFR, esto evita la necesidad de incorporar dichos nutrientes en el medio de cultivo, lo que permite luego realizar la selección clonal (Cacciatore, Chasin, and Leonard 2010; Jayapal et al. 2007; White et al. 1998).

El sistema DHFR también permite la amplificación eficiente del gen clonado cuando las células se cultivan con metotrexato (MTX), un análogo de ácido fólico que bloquea la actividad de la enzima DHFR, por lo que las células transfectadas deben hacer frente a la disminución de la actividad enzimática de la DHFR, para ello las células incorporan en su genoma un amplificado número de copias del gen de la DHFR. La cercanía del gen DHFR y el gen de interés transfectado asegura entonces que el transgen también se amplifique, aumentando de esta manera las posibilidades de asegurar una línea celular de alta producción de la proteína de interés (Jayapal et al. 2007). Este procedimiento se repite utilizando concentraciones crecientes de MTX con el

fin de aumentar la presión selectiva hasta que solo prevalezcan las células con números de copia de genes muy altos. Como resultado se obtienen un grupo de células con sitios de integración variables y números de copias de genes aumentados. La amplificación génica mediante MTX es un cuello de botella en la producción de biofármacos ya que se requieren varios ciclos de amplificación y selección para obtener células con altos números de copias de genes, un proceso que conlleva varios meses de trabajo. Además, el aumento de las concentraciones de MTX solo es capaz de seleccionar clones de alto número de copias hasta cierto punto (Cacciatore et al. 2010). Este paso conduce al aislamiento de un conjunto de células enriquecidas para clones con una alta productividad específica. Sin embargo, este grupo es heterogéneo y contiene células con diferentes sitios de integración, números de copias y variadas productividades específicas. Por lo que el siguiente paso es aislar los clones individuales con las mayores tasas de productividad y crecimiento posibles, y la mejor calidad del producto (Jayapal et al. 2007), esta es la finalidad del clonado celular, asegurar que todas las células de un cultivo descendan de una única célula. Dicha metodología se puede llevar a cabo de dos maneras: empleando los llamados cilindros de clonado y/o utilizando la técnica de dilución límite (ver más adelante).

3.6 ETAPAS DE UN PROCESO PRODUCTIVO DE BIOFÁRMACOS UTILIZANDO CÉLULAS CHO

El desarrollo y producción de proteínas recombinantes en cultivo de células CHO se puede dividir básicamente en cuatro etapas (Fig. 7):

1. Diseño del vector de expresión a utilizar.
2. *Upstream processing* o etapa de cultivo celular.
3. *Downstream processing* o etapa de purificación.
4. Caracterización del producto obtenido.
5. Aprobación sanitaria para su comercialización.

La primera etapa se basa en el diseño y clonado de vectores de expresión, esta se puede realizar empleando herramientas bioinformáticas, metodología denominada “in silico”, por medio de las

cuales se pueden evaluar factibilidad teórica, traducción de secuencias nucleotídicas y analizar fragmentos de digestión por enzimas de restricción.

Una vez definido el vector de expresión a utilizar, el siguiente paso es obtener células estables productoras de la proteína de interés en cultivo celular, para ello se realiza la transfección del material genómico del vector hacia las células CHO, permitiendo así la integración del mismo al genoma celular.

Luego se utilizan diferentes estrategias para incrementar la cantidad de proteína de interés a producir, como ser amplificación génica (ver sección 6.7), la adaptación de las células al crecimiento en suspensión en alta densidad celular para su cultivo en bioreactores, entre otras, lo cual permite que sea viable su producción a nivel industrial.

Posteriormente se realiza la purificación del producto obtenido por diferentes técnicas cromatográficas, entre las más utilizadas encontramos la cromatografía de intercambio iónico (aniónico o catiónico) la cual se basa en la separación de proteínas tomando como principio la carga neta superficial de las mismas la cual varía de acuerdo con el pH circundante, por ejemplo cuando el pH se encuentra por encima del punto isoeléctrico de una proteína en particular esta se unirá a una resina de intercambio aniónico. La elución de la proteína unida a la resina se logra aumentando la fuerza iónica (concentración salina) de la solución buffer. Empleando esta estrategia y controlando los cambios en la fuerza iónica usando diferentes gradientes de concentración salina se puede lograr la separación diferencial de una mezcla compleja de proteínas en una forma concentrada y purificada.

Finalmente se realiza la caracterización de la proteína purificada para evaluar, entre otros aspectos, su nivel de pureza, estructura molecular y funcionabilidad, como así también determinar si cumple con los requerimientos de la autoridad sanitaria que permitan lograr su aprobación y posterior comercialización.

Al mismo tiempo para concluir el proceso de aprobación del biofármaco se requieren la realización de diferentes estudios pre-clínicos y clínicos los cuales se deben evaluar en forma diferenciada para cada producto en particular entre el laboratorio a producir el fármaco y la autoridad sanitaria correspondiente.

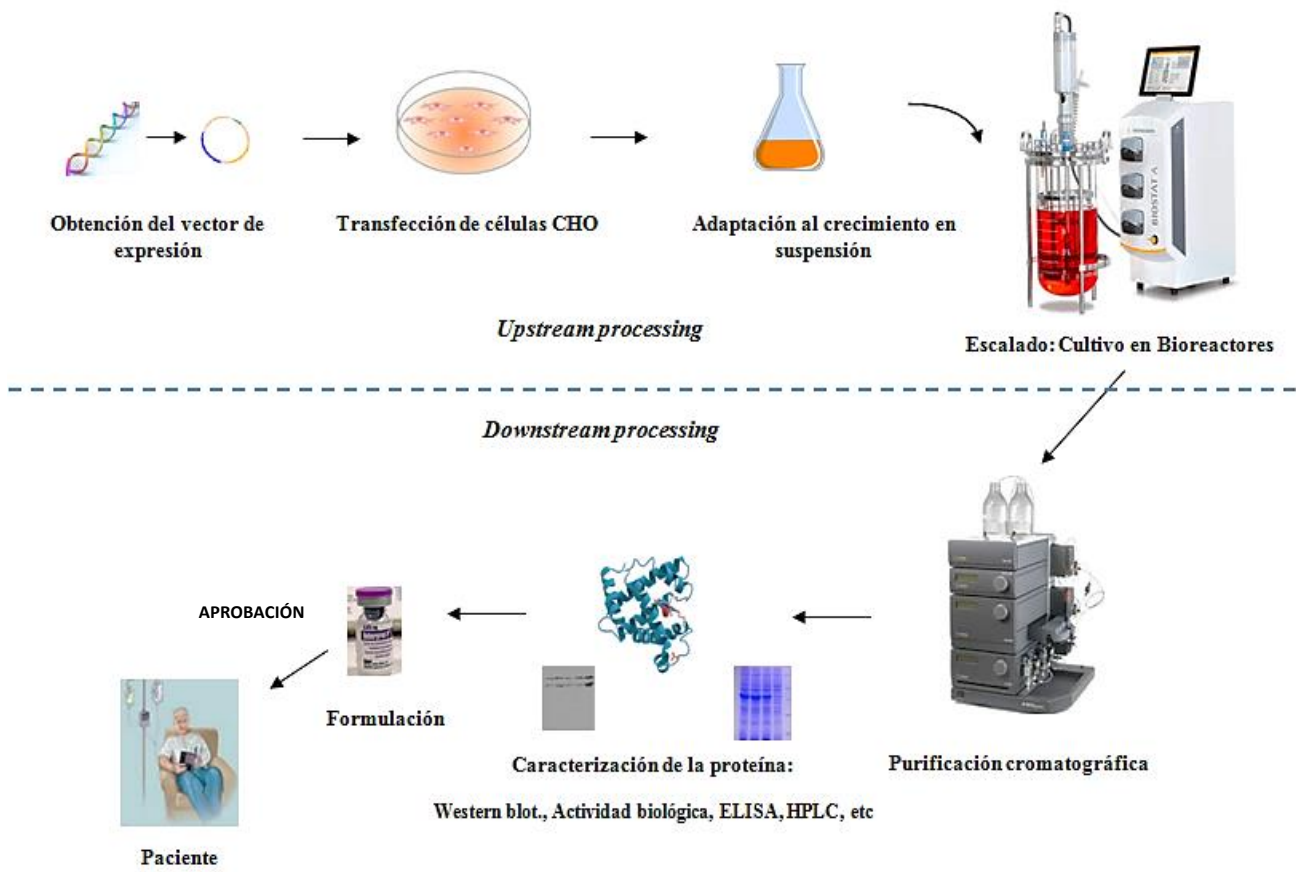


Figura 7: Esquema de un proceso de desarrollo y producción de un biofármaco.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL.

- Expresión y purificación de FIX humano recombinante (FIXr) a partir de células de Ovario de Hámster Chino (CHO) en cultivo.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Análisis de la expresión de FIXr en transfecciones transientes de células CHO. Aislamientos de clones que expresan FIXr en forma estable.
- Amplificación del gen codificante de FIXr en células CHO en cultivo. Selección de clones celulares con elevada actividad de FIXr.
- Desarrollo y optimización de una estrategia de purificación cromatográfica selectiva del FIXr biológicamente activo a partir del medio del cultivo de clones celulares estables productores de esta proteína. Actividad específica y rendimiento del FIXr purificado.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 LÍNEAS CELULARES

Durante el desarrollo del presente trabajo se utilizaron las líneas celulares comerciales y que se detallan a continuación.

- Línea celular CHO/DHFR⁻ (CHO duk-) (ATCC): Línea celular de ovario de hámster chino deficiente en la enzima dihidrofolato reductasa. La misma se utilizó para la generación de clones celulares productores de FIXr.
- Cepa bacteriana *Escherichia coli* TOP 10 (Invitrogen): Cepa utilizada para el aislamiento y amplificación de diferentes vectores de expresión.

5.2 MEDIOS DE CULTIVO

6.2.1 Medios de cultivo para células CHO/DHFR⁻

- Medio de cultivo completo: Medio comercial MEM Alpha (Minimum Essential Medium) +++ (L-glutamina, Ribonucleosides, Desoxyribonucleosides) (Gibco), suplementado con SFB al 10 % (V/V) (Gibco), GlutaMAX al 1 % (V/V) (Gibco) y aminoácidos no esenciales al 1 % (V/V) (Gibco). Este medio de cultivo se utilizó para el mantenimiento del stock de células CHO/DHFR⁻.
- Medio de cultivo de selección: Medio Comercial MEM Alpha +-- (L-glutamina, Ribonucleosides, Desoxyribonucleosides) (Gibco), suplementado con SFB dializado (SFBd) al 10 % (V/V) (Gibco), *GlutaMAX* al 1 % (V/V) y aminoácidos no esenciales 1 % (V/V). Este medio se utilizó en las etapas de transfección, selección, adaptación y cultivo de clones productores de FIXr.

El SFB y el SFBd utilizados para suplementar los medios de cultivo fueron previamente calentados en baño de agua termostatzado a 56 °C durante 30 min, con el fin de inactivar la cascada del complemento que podría inducir lisis celular.

Durante el proceso de transfección se utilizó medio de cultivo completo, medio de selección y medio de transfección, este último es un medio de cultivo comercial reducido en suero denominado OptiMEM (Gibco).

Como se comentó en la sección 4.3, el FIX es un factor dependiente de vitamina K. Por este motivo para obtener FIXr con actividad biológica en cultivo de células CHO/DHFR⁻ es necesario adicionar a los medios de cultivo una solución de vitamina K. Para ello se preparó una solución concentrada de la Vitamina K3 (Sigma-Aldrich) en aguaestéril y apirógena (Gibco). Se tomó un volumen adecuada de la misma y se agregó a los medios de cultivo de manera de obtener una concentración final de 200nM (L. C. Wasley et al. 1993).

5.3 MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS DE CÉLULAS CHO/DHFR⁻.

Las células CHO/DHFR⁻ se cultivaron en una estufa a 37 °C, atmósfera de CO₂ al 5 % y humedad al 80 % (Certomat CT-plus, Sartorius Stedim Biotech), empleando los siguientes sistemas de cultivo:

- Placas de cultivo de células de 60 x 15 mm y de 100 x 20 mm (Nest Biotechnology Co., Ltd).
- Placas de poliestireno de 6, 12 y 98 pocillos (Corning Incorporated).

Los subcultivos de células CHO/DHFR⁻ que crecen en adherencia requieren del uso de proteasas con el fin de liberar las células de la superficie a la cual se encuentran ancladas. En este trabajo se utilizó el siguiente procedimiento:

1. Se retiró en forma total el medio de cultivo mediante pipeta.
2. Se adicionó DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) al 1% (V/V) (Gibco) para lavar y eliminar cualquier resto de factores con actividad anti-tripsina presentes en el SFB.
3. Se agregó una solución de tripsina (TrypLE Express, Gibco), diluida en DPBS, en una relación de 20 µL por cm², distribuyéndose homogéneamente sobre las células dejándola actuar por 2 min en estufa a 37°C. El proceso de desorción de las células fue controlado por observación al microscopio, y cuando las células estuvieron despegadas, verificado por su forma redondeada, se agregó medio de cultivo fresco a razón del doble de volumen agregado de tripsina de manera de inactivar completamente la misma, se homogenizó la suspensión cuidadosamente.

4. Se tomó una alícuota para el recuento de células y con este resultado se realizó la dilución correspondiente con medio de cultivo fresco.

6.3.1 Determinación de la concentración de células totales y viabilidad celular

La determinación de la viabilidad celular de un cultivo se realizó por la técnica de exclusión del colorante. En este trabajo se utilizó el colorante el azul de tripán que tiñe las células no viables de azul, sin penetrar en las células intactas.

El recuento celular se realizó en un contador automático de células Countess II (ThermoFisher), para ello la suspensión celular se diluyó al medio en solución colorante y se cargó la cámara de recuento, por duplicado. Este equipo determina automáticamente la cantidad de células totales, vivas y muertas, como así también el porcentaje de viabilidad obtenido.

6.3.2 Criopreservación

La conservación de células por congelación o criopreservación es un método que garantiza mantener intactas las propiedades metabólicas de las mismas al momento de ser congeladas (Hasegawa 1996).

Para el proceso de criopreservación, primero se realizó el recuento celular de una suspensión, determinándose el volumen de suspensión necesario para congelar 1×10^7 células viables por mililitro. Este volumen se centrifugó (Presvac DCS-16-RTV) a 1000 rpm por 3 min a temperatura ambiente, el pellet celular se resuspendió en una mezcla de SFB y dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma), en una relación 90:10, dispensándose 1 mL por criotubo (Greiner Bio-one), los que luego se congelaron de manera gradual utilizando el dispositivo *Mr-Frosty* (Nalgene), y llevados a freezer de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 hs. Este recipiente contiene alcohol isopropílico, permitiendo que en el interior del mismo la temperatura disminuya a razón de $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por minuto. Finalmente los criotubos se almacenaron en termos de nitrógeno líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ para preservar su viabilidad. El descongelado de los criotubos se hizo de manera rápida, colocando los viales recién retirados del nitrógeno líquido en un baño de agua termostaticado a 37°C (Vicking). Inmediatamente a esto el contenido del criotubo se agregó a un tubo estéril conteniendo 5 ml de medio de cultivo.

Dicha suspensión se centrifugó a 1000 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente. Esta última operación se realiza para eliminar el DMSO el cual resulta tóxico para las células. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en el medio de cultivo correspondiente para cada caso.

5.4 DISEÑO Y OBTENCIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN

Se desea aclarar que el diseño de los vectores de expresión se realizó en forma conjunta con la colaboración de la Dra. Arias Cristina (Hemoderivados Laboratorio Farmacéutico UNC).

6.4.1 Diseño de vectores de expresión

Se realizó el diseño y clonado de vectores de expresión “in silico” utilizando herramientas bioinformáticas de acceso libre en la red, como ser: <http://www.bioinformatics.org/sms2/> y <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>, a través de las cuales se corroboró su factibilidad teórica, verificó la traducción de secuencias nucleotídicas y analizó fragmentos de digestión por enzimas de restricción.

Como vector de expresión en mamíferos se seleccionó el plásmido pIRES (Clontech Cat. # 631605) debido a que está diseñado para expresar simultáneamente dos genes de interés y el hecho de que estén físicamente próximos es indispensable para la amplificación génica posterior en células eucariotas. El plásmido pIRES (Fig. 8A) permite la expresión de grandes niveles de dos genes de interés a partir de un único RNA mensajero bicistrónico, este vector contiene el sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) del virus de la encefalomiocarditis, flanqueado por dos sitios de múltiple clonado (MCS A y B). La expresión del transcripto bisistrónico es dirigida por el promotor constitutivo del citomegalovirus (PCMV) ubicado aguas arriba del MCS A. Entre el PCMV y el MCS A se localiza una secuencia de intervención que estabiliza el mensajero (Huang and Gorman 1990) y la cual se elimina eficientemente durante el proceso de corte y empalme del RNA. La señal de poliadenilación que dirige el correcto procesado del extremo 3' del mensajero, se encuentra río abajo del MCS B.

El vector pIRES incluye el gen de resistencia a la neomicina (Neo^r) para seleccionar células de mamífero transfectadas, la expresión de Neo^r es dirigida por el promotor SV40 y en la región 3' se localiza una señal de poliadenilación sintética.

Tomando como base el mencionado plásmido pIRES comercial se diseñaron dos estrategias de clonado las cuales se detallan a continuación:

- Estrategia 1: pIRES-FIX-PACE-DHFR "ad-hoc"

Como material de partida fue necesario contar con los cDNA de FIX y PACE humanos así como el marcador de selección DHFR de ratón. Debido a esto se decidió hacer sintetizar un plásmido con las siguientes especificaciones (Fig. 8B):

- Estructura general del vector pIRES.
- MCS: en el sitio A se introdujo la secuencia del gen que codifica FIX humano y en el sitio B al gen de PACE humana, ambos optimizados para su expresión en células CHO.
- Marcador de selección: DHFR, se cambió la Neo^r por la enzima DHFR de ratón reemplazando el cDNA de la enzima aminoglucósido 3'-fosfotransferasa II por el de DHFR.
- Se eliminaron ciertos sitios de restricción dentro de la secuencia del vector, que estaban presentes en los nuevos MCSs.

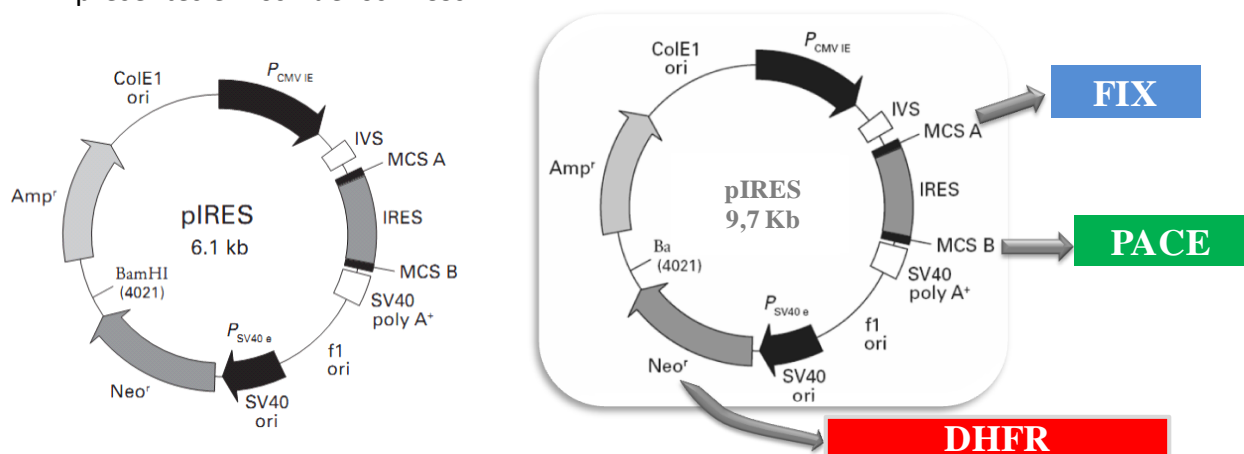


Figura 8: Esquema de los vectores. A) pIRES comercial y B) pIRES-FIX-PACE-DHFR "ad-hoc"

Se solicitó a la empresa encargada de realizar la síntesis del vector personalizado que elimine dentro de las secuencias de FIX, PACE y DHFR todos los sitios de restricción flanqueantes a fin de facilitar los subclonados posteriores.

De esta manera se obtuvo el vector sintético pIRES-FIX-PACE-DHRF (pIRES-FPD) de 9,7 Kb permitiendo la expresión en células CHO de los tres genes a la vez.

- Estrategia 2: pIRES-FIX-PACESol-DHRF

Esta estrategia consistió en modificar la construcción pIRES-FPD de manera de obtener una construcción que exprese la enzima PACE soluble, que denominamos PACESol, en remplazo de la enzima PACE de membrana (Fig. 9), utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), obteniendo la construcción pIRES-FIX-PACESol-DHRF (pIRES-FPSolD).

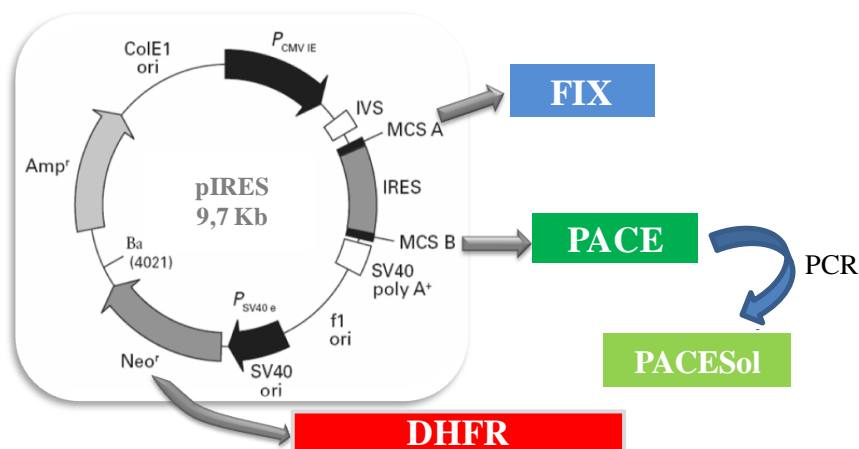


Figura 9: Esquema del vector pIRES-FIX-PACESol-DHRF.

Se realizó el diseño de oligonucleótidos iniciadores de manera tal de crear dentro de la secuencia de PACE un codón de stop prematuro, con el objetivo de eliminar de la proteína los aa correspondientes al dominio transmembrana y su cola citoplásmica, los que permiten la localización de la enzima dentro del aparato de Golgi (Rehemtulla et al. 1992); (Wise et al. 1990), por lo que se obtiene una proteína activa no solo dentro del aparato de Golgi, sino también en el medio de cultivo en el que es secretada, suponiendo una mayor eficiencia en la escisión del propéptido del FIX y concomitantemente una mayor actividad biológica del mismo (L. C. Wasley et al. 1993).

Con el objetivo de evaluar diferentes temperaturas de hibridación de los oligonucleótidos iniciadores se realizó la PCR utilizando el termociclador My Cycler Thermal Cycler versión 1.065

(Bio-rad), el cual ofrece la posibilidad de realizar gradientes de temperaturas, permitiendo encontrar las condiciones óptimas de la reacción.

Se preparó una mezcla de reacción de manera de obtener un volumen suficiente de la misma para realizar nueve reacciones: 45 uL de ADN purificado; 4,5 uM de cada uno de los oligonucleótidos iniciadores (*forward* y *reverse*); 1,8 mM de dNTPs; 13,5 mM de Mg₂Cl₂; 22,5 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen); buffer de reacción 10 X (Invitrogen), en un volumen final de reacción de 450 uL. Además, se realizó un control negativo sin el agregado de templado.

Las condiciones de ciclado fueron las siguientes, un paso de desnaturalización inicial del ADN a 94 °C por 2 min y posteriormente 30 ciclos de: desnaturalización del templado (94 °C por 1 min), hibridación de oligonucleótidos iniciadores (gradiente de temperatura entre 60 a 75 °C por 1 min) y extensión del oligonucleótido (72 °C por 2:30 h).

Se analizó el ADN obtenido a las diferentes temperaturas en geles de agarosa (Fig. 10), se observó que a todas las temperaturas ensayadas se produjo el amplicón correspondiente, siendo 61.1 °C la temperatura donde se obtuvo la mayor cantidad del mismo.

Las condiciones de reacción quedaron determinadas de la siguiente manera: un paso de desnaturalización inicial de 94 °C por 2 min y posteriormente 30 ciclos que incluyen: desnaturalización del templado (94 °C por 1 min), hibridación de oligonucleótidos iniciadores (61,1 °C por 1 min) y extensión del oligonucleótido (72 °C por 2:30 h).

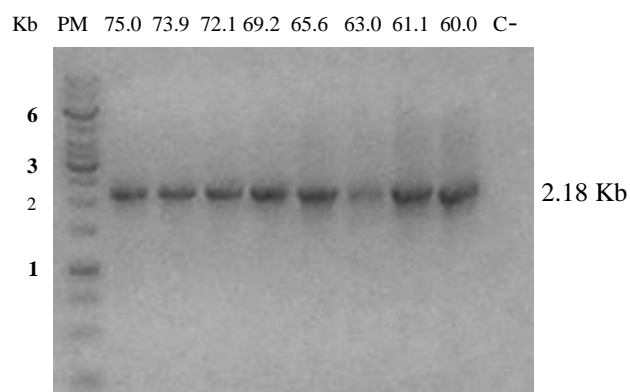


Figura 10: Electroforesis en gel de agarosa de los amplicones del ADN de la PACESol (2.18 Kb) obtenidos a las diferentes temperaturas de hibridación (60.0 a 75.0 °C). Siembra: 5 ul de muestra por carril. PM: marcador de peso molecular (Gene Ruler 1 Kb, Invitrogen). C- : Control negativo de PCR.

Se preparó una mezcla de reacción de manera de poder llevar a cabo tres reacciones de PCR, se verificó la correcta síntesis de los amplicones en gel de agarosa (Fig.11) y finalmente se realizó un pool de los productos de las tres reacciones y se purificaron, como se explica en la sección 6.4.3. Se realizaron digestiones enzimáticas (según se explica en la sección 6.4.4) del producto purificado (denominado a partir de ahora inserto) y del vector pIRES-FPD, con las enzimas de restricción correspondientes.

Una alícuota de la digestión se sembró en un gel de agarosa (Fig. 12), donde se pudo observar una banda ADN de 7,3 Kb la cual corresponde al vector cortado pIRES sin el ADN de la PACE, esta última se puede apreciar en el gel como una banda de 2,4 Kb.

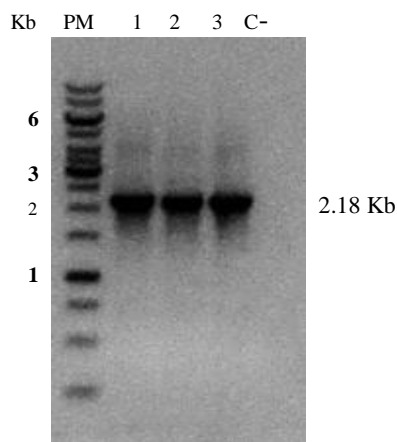


Figura 11: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de las 3 reacciones de la PCR (Carril 1, 2 y 3). C- : Control negativo de PCR.

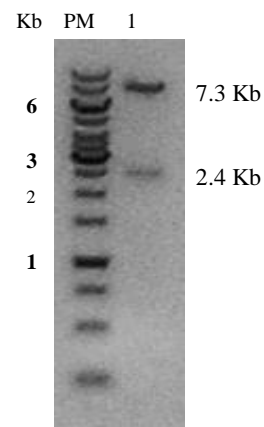


Figura 12: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la digestión enzimática.

Se cortó el gel de agarosa en la banda de ADN correspondiente al vector y se purificó.

Se realizó la digestión enzimática tanto el inserto como el vector purificado, el producto de cada digestión se purificó y se realizó la reacción de ligación correspondiente, de manera de obtener la construcción pIRES/FPSold.

A partir de aquí se continuó con el protocolo correspondiente (ver sección 6.4.2) para permitir el secuenciamiento de la construcción de interés, como así también para obtener cantidades suficientes de vector para la transfección de células eucariotas.

Se enviaron a secuenciar 6 clones de ADN correspondientes al vector pIRES/FPSolD a una empresa especializada, los resultados obtenidos mostraron la secuencia esperada en todos los clones.

6.4.2 Transformación de bacterias y preparación de ADN plasmídico.

Con el fin de obtener cantidades suficientes del vector de expresión de interés se realizó la transformación de bacterias *Escherichia coli* TOP 10 competentes, el ADN plasmídico se purificó empleando el kit comercial Maxiprep (ThermoFisher) siguiendo el protocolo del proveedor.

La integridad de los plásmidos purificados se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % (P/V), y la concentración y pureza de los mismos se determinó por medición de su absorbancia a $\lambda=260$ nm y $\lambda=280$ nm en espectrofotómetro GeneQuant (Pharmacia Biotech).

6.4.3 Purificación de ADN a partir de geles de agarosa.

Los fragmentos de ADN separados por electroforesis en geles de agarosa fueron purificados utilizando el kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se determinó la pureza y la concentración de los fragmentos mediante lectura espectrofotométrica.

6.4.4 Digestiones enzimáticas.

Las digestiones con enzimas de restricción se realizaron respetando las condiciones recomendados por el proveedor (Biolabs). En todos los casos la reacción se llevó a cabo durante toda la noche a 37°C, empleándose de 1 a 5 U de enzima por cada μ g de ADN en un volumen final de 50 μ L.

Luego de las digestiones enzimáticas, los fragmentos se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa para su posterior análisis y/o purificación.

6.4.5 Reacciones de ligación de ADN.

Para realizar las ligaciones de inserto/plásmido se utilizó la relación 3:1. Utilizando la enzima T4 DNA Ligasa (Fermentas). La mezcla de reacción se incubó 2 h a temperatura ambiente. Se incluyó un control de plásmido religado reemplazando el inserto por agua estéril.

5.5 TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS EUKARIOTAS

Se utilizó el método de transfección mediante lípidos catiónicos o lipofección (Martin-Montañez et al. 2010).

En este trabajo se llevaron a cabo dos tipos de transfecciones, transientes y estables, ambas con las construcciones diseñadas (pIRES/FPD y pIRES/FPSolD) de manera independiente.

6.5.1 Transfecciones transientes

La expresión transiente tiene la ventaja de generar en un tiempo relativamente corto cantidades moderadas de producto, hasta que las nucleasas celulares degradan el vector. Permitiendo una caracterización preliminar del producto, en lo que se refiere a la secreción de la proteína, presencia de modificaciones post-traduccionales, actividad biológica, etc.

EL protocolo realizado para obtener células que expresan FIXr de manera transiente se detalla a continuación:

1. Se realizó el cultivo de células CHO/DHFR⁻ en medio de cultivo completo y cuando el mismo se encontraba en fase de crecimiento exponencial se separaron las células de la placa de cultivo por desprendimiento enzimático con tripsina, las células se contaron y se resuspendieron nuevamente en medio completo.
2. La suspensión celular se sembró en placas de cultivo de 6 cm de diámetro de manera de obtener una concentración de $0,8 \times 10^6$ cél.mL⁻¹ por placa, las cuales se incubaron aproximadamente por 24 h a 37 °C, hasta que la densidad celular alcanzó el 80 % de confluencia.
3. Transcurrido dicho tiempo se eliminó el sobrenadante de cada placa, se lavaron las mismas con DPBS 1 X y se adicionó a cada una 7 mL de medio de transfección. Paralelamente se preparó el complejo de transfección:

- a) Se mezclaron 1 ug.uL^{-1} de ADN plásmidico (vector pIRES/FPD o pIRES/FPSolD) y lipofectamina 2000 (Invitrogen) en una proporción de 10:80.
 - b) Se tomaron 10 uL de la mezcla anterior y se les agregó 790 uL de medio de transfección. (solución A).
 - c) Se incubaron 80 uL de lipofectamina con 720 uL de medio de transfección, por 5 min a temperatura ambiente (solución B).
 - d) Se preparó una mezcla volumen a volumen de las soluciones A y B, se incubó dicha mezcla por 20 min a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos.
4. Se agregó el complejo de transfección a las placas y se incubó 2 h a 37°C .
5. Luego se lavaron las placas con DPBS y se adicionó medio completo conteniendo vitamina K3 (200 nM), se incubó por 48 hs a 37°C .
6. Transcurrido dicho tiempo se cosechó el sobrenadante, el cual se centrifugó a 1000 rpm por 3min, se tomó el sobrenadante obtenido y se conservó a -70°C hasta su análisis por determinación de actividad biológica (ver más adelante).

6.5.2 Transfecciones estables

Las transfecciones estables permiten la integración del ADN exógeno al genoma de las células, para ello los vectores de expresión fueron previamente linealizados por digestión enzimática con la enzima de restricción PmeI (Invitrogen), la cual no produce cortes en ninguna de las secuencias codificantes de interés dentro de los vectores utilizados.

Los pasos de transfección fueron los mismos que los antes mencionados para las transfecciones transientes hasta el punto 4 inclusive (transfección de los complejos a las células).

Luego se lavaron las placas con DPBS y se cambió a medio completo, las placas se incubaron 24 h a 37°C .

Transcurridas las 24 h se eliminó el medio completo y se adicionó medio de selección conteniendo vitamina K3 (200 nM).

Los cultivos celulares se mantuvieron en dicho medio entre 10 a 15 días en estufa de cultivo, tiempo necesario para la formación de colonias celulares.

5.6 CLONADO CELULAR

Como se explicó anteriormente, las líneas celulares estables constituyen un grupo heterogéneo de células que presentan diferencias en niveles de expresión, características morfológicas y de crecimiento. Los diferentes niveles de expresión pueden deberse a los diferentes números de copias del gen de interés integradas al cromosoma como así también a la integración en sitios con distinta actividad transcripcional (Cacciatore et al. 2010).

La finalidad del clonado celular es asegurar que todas las células de un cultivo descendan de una única célula, es decir que sean genéticamente idénticas (clones), permitiendo seleccionar células altamente productoras de la proteína de interés de aquellas que no lo son.

6.6.1 Clonado celular utilizando cilindros de clonado

En una primera instancia, luego de cada proceso de transfección estable y transcurrido el tiempo necesario para la formación de colonias se realizó el aislamiento de las mismas utilizando los llamados cilindros de clonado, para ello estos recipientes cilíndricos de poliestireno de pequeñas dimensiones, 4,7 x 8,0 mm (Sigma) fueron colocados directamente sobre las colonias permitiendo su aislamiento, las células se levantaron de la placa de cultivo agregando una solución de tripsina. Las células de diferentes colonias se sembraron en placas de cultivo de 6cm, previa eliminación de la tripsina agregada, y se cultivaron en medio de selección conteniendo vitamina K3 (200 nM), se incubaron por 48 h en estufa de cultivo, finalmente se cosechó el sobrenadante del cultivo celular, se centrifugó a 1000 rpm por 3 min, se tomó el sobrenadante obtenido y se determinó FIXr por coagulometría (ver más adelante). De esta forma se seleccionaron los clones productores de FIXr para continuar hacia la etapa de amplificación génica.

6.6.2 Clonado celular utilizando el método de dilución límite

Finalizado el proceso de amplificación génica (ver más adelante) se llevó a cabo el clonado celular por el método de dilución límite (Whitlock and Muller-Sieburg 1990). Este método se basa en realizar una dilución apropiada de una suspensión celular de manera de obtener una única célula por unidad de volumen. Para ello los clones resultantes del proceso de amplificación génica fueron cultivados en medio de cultivo de selección, estos se cultivaron 24 h

en estufa, luego de lo cual se realizó el recuento celular, con el dato de la concentración de células viables se realizó la dilución apropiada de manera de sembrar en el primer pocillo de una placa de 96 pocillos un total de 200 células. Con pipeta multicanal se dispensó en la palca de 96 pocillos 100 uL de medio de cultivo de selección por pocillo, excepto en el primer pocillo donde se dispensó 200 uL de la dilución de la suspensión celular, de este pocillo se tomó 100 uL y se realizaron diluciones al medio en dirección descendente en la primera columna de la placa descartando 100 uL del último pocillo de la primera columna, de forma de obtener en cada pocillo 100 uL de volumen final. Luego con pipeta multicanal se agregó 100 uL de medio de selección en la primera columna de la placa y de aquí con dirección de izquierda a derecha con pipeta multicanal se realizaron diluciones al medio hasta la última columna, de la cual se descartó 100 uL de cada pocillo, de forma de obtener en cada uno de los pocillos de la placa un volumen final de 100 uL. Luego se agregó a todos los pocillos 100 uL de medio de cultivo de selección, de esta forma el volumen final de cada pocillo fue de 200 uL. Se incubó la placa en estufa de cultivo y se observó periódicamente, el clonado se consideró exitoso cuando se observó el crecimiento de colonias provenientes de una única célula madre en al menos uno de los pocillos en los que se sembró la dilución más alta. Aquellos pocillos que presentaban inicialmente más de una célula fueron descartados.

Los clones celulares provenientes de una única célula se levantaron de la placa utilizando tripsina, luego de lo cual fueron sembrados en placas de cultivo conteniendo medio de selección y fueron crecidos hasta densidad adecuada para poder ser evaluados por determinación de su actividad biológica de FIXr (ver más adelante).

5.7 AMPLIFICACIÓN GÉNICA

Una vez realizada la transfección y selección clonal de los mejores clones productores de FIXr, se procedió a realizar la amplificación génica. Este proceso se llevó a cabo añadiendo progresivamente a los cultivos celulares de los clones seleccionados concentraciones crecientes de MTX (Sigma), el cual actúa como un inhibidor competitivo de la enzima DHRF (Jayapal et al. 2007), por lo que las células CHO/DHRF⁻ para poder sobrevivir en medio de cultivo de selección necesitan incorporar en su genoma un mayor número de copias del gen de la DHRF a medida

que aumenta la concentración de la droga en el cultivo, y concomitante a esto los genes de la enzima PACE y del FIX.

Las concentraciones de MTX variaron desde 20 nM hasta 500 nM.

El protocolo utilizado fue el siguiente:

1. Los clones celulares seleccionados se cultivaron en medio de cultivo de selección, luego de alcanzada una densidad celular de aproximadamente el 80 % se lavó la placa de cultivo con DPBS y se adicionó medio fresco de selección conteniendo MTX en la concentración más baja. Se incubó en estufa y se observaron periódicamente en microscopio para evaluar su morfología y crecimiento.

2. Luego de determinado período y cuando las células se encontraban en óptimas condiciones en cuanto a su morfología y crecimiento, se realizó un repique de las mismas. Acción que se repitió 3 veces para asegurar la correcta adaptación de las células a la nueva condición de crecimiento.

3. Antes de avanzar hacia una nueva concentración de MTX, las células se evaluaron en cuanto a su producción de FIXr medido por actividad biológica en coagulómetro (ver más adelante). De aquí se seleccionaron los clones productores cuyo valor de actividad biológica fue igual o mayor al que poseían antes de comenzar el proceso de amplificación génica.

4. Los clones seleccionados en el paso anterior se sometieron a una nueva concentración de MTX para su adaptación.

*Se repitieron los pasos 1, 2 y 3 con todas las concentraciones de MTX ensayadas.

5.8 ACTIVIDAD BIOLÓGICA

La actividad biológica "in vitro" del FIXr se cuantificó por medio de un método coagulométrico, que se basa en la medición por densitometría del tiempo de formación de un coagulo en un plasma normal pero carente de FIX. El FIX necesario para que se lleve a cabo la reacción de coagulación es aportado por la muestra de referencia y/o la muestra a analizar. El tiempo de coagulación medido por el instrumento, Coagulómetro ACL 200 (Instrumentation Laboratory), es directamente proporcional a la cantidad de FIX presente en el analito. Las determinaciones se realizaron de manera automatizada empleándose plasma normal como referencia. Se

adicionaron como complementos para la reacción de coagulación: APTT-P (hemo-medica, Medica-Tec SRR) y CaCl_2 0,25 mM (hemo-medica, Medica-Tec SRR). Las diluciones de las muestras se realizaron en buffer Imidazol-ASH (Imidazol 1,7 g, NaCl 2,93 g, ASH 1 % (V/V); pH 7,35).

5.9 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

La cuantificación de proteínas totales se realizó empleando el método de Bradford (Bradford 1976). Se empleó la técnica en tubo y las determinaciones se realizaron empleando curvas de calibrado realizadas con albúmina sérica humana (ASH) como estándar. La concentración de proteínas totales en las muestras incógnitas se calculó mediante interpolación de los valores de absorbancia obtenidos para cada muestra en la curva de calibración.

5.10 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (PAGE) Y WESTERN BLOT

La electroforesis en geles de poliacrilamida y el western blot se realizaron en el sistema de electroforesis y transferencia modular vertical Mini-Protean Tetra System (Bio-Rad).

Se prepararon geles de apilamiento en una concentración de monómero/ramificante (acrilamida/bisacrilamida) del 5 % (P/V) (Sigma) y geles de separación en una concentración acrilamida/bisacrilamida del 12 % (P/V).

Para la detección inmunológica de FIXr con anticuerpos específicos los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham Hybond-ECL, GE Healthcare) y se realizó la reacción correspondiente según protocolos establecidos revelando por reacción de quimioluminiscencia (kit Super Signal West Pic Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific).

5.11 PURIFICACIÓN CROMATOGRÁFICA DE FIXr

Se realizó un proceso de purificación cromatográfica de FIXr a escala laboratorio, se utilizó una columna prellenada con la resina de intercambio aniónico fuerte *Q-Sepharose* de 1 mL de volumen (GE Healthcare), posee una matriz cromatográfica de agarosa con ligandos de amonio cuaternario de carga positiva permitiendo así la unión de proteínas con carga negativa, la

elución se basa fundamentalmente en la aplicación de una solución de elevada fuerza iónica que compite por las proteínas unida.

1. Como primera etapa se ensayaron diferentes composiciones y combinaciones de soluciones buffer trabajando en forma de gradiente para evaluar las condiciones de lavado de impurezas y elución del FIXr.
2. Finalmente se realizó un proceso de purificación de un clon celular estable a partir de un cultivo de células CHO/DHFR⁻.

Las cromatografías se llevaron a cabo en un cromatógrafo AKTA purifier equipado con un colector automático de fracciones Frac-920 (GE Healthcare). Este equipo permite, realizar gradientes de concentración salina utilizando dos soluciones de diferente composición.

El flujo de trabajo utilizado durante todo el proceso fue 1 ml.min⁻¹.

5.11.1 Evaluación de las condiciones de lavado y elución cromatográfica

Para llevar a cabo la puesta a punto de la cromatografía de purificación del FIXr se realizaron dos cromatografías en gradientes de concentración salina (NaCl) y una en gradiente de concentración de CaCl₂.

Para poner a punto la cromatografía se utilizó el fármaco comercial BeneFIX (Pfizer), para simular la matriz de un cultivo celular de células CHO/DHFR⁻ este FIXr comercial se reconstituyó en 5 mL de agua y luego se diluyó en medio de cultivo de selección conteniendo 200 nM de vitamina K3 y SFBd al 10 % (V/V).

Dicha muestra se filtró a través de membrana de 0,22 um de tamaño de poro (Sartorius) y se sembró en la columna, previamente con equilibrada con 5 volúmenes de columna de buffer de equilibrio. Finalizada la siembra se realizó el gradiente correspondiente.

A) Cromatografía 1: gradiente de fuerza iónica

El objetivo de esta cromatografía fue evaluar la afinidad del FIXr por la resina *Q-Sepharose* como así también la fuerza iónica necesaria para su elución.

El gradiente de fuerza iónica se realizó incrementándose gradualmente la conductividad desde 0 a 50 mS.cm⁻¹ utilizando 20 volúmenes de columna. Se recolectaron fracciones de 1 mL durante

todo el proceso a fin de determinar proteínas totales y actividad biológica. Con estos últimos datos se determinó el factor de purificación y el rendimiento de la cromatografía.

Soluciones buffer utilizadas:

- Buffer de equilibrio: Tris-HCl 50 mM; arginina 1 % (V/V) y lisina 1 % (V/V) (ambos aa al 1 % (V/V)); pH 7,4.
- Buffer de elevada fuerza iónica: Tris-HCl 50 mM; NaCl 1 M; arginina y lisina (ambos aa al 1 % (V/V)); pH 7,4.

B) Cromatografía 2: gradiente de fuerza iónica + CaCl₂

La sobreexpresión de FIXr en células CHO en cultivo, podría provocar que una fracción de la proteína no se encuentre totalmente γ -carboxilada dado que estas células generalmente no pueden procesar todo el FIXr traducido debido a la limitación de algunas enzimas involucradas en el proceso de γ -carboxilación (Ribeiro et al. 2013).

Es conocido que el Ca⁺² provoca un cambio conformacional en la molécula de FIX si la misma está γ -carboxilada, por lo tanto el Ca⁺² facilita su elución desde la matriz cromatográfica aún a fuerzas iónicas bajas (Liu, Jonebring, Hagstrom, et al. 2014). A fin de evaluar la purificación selectiva para la forma correctamente γ -carboxilada de FIXr se realizó una cromatografía en gradiente de conductividad más el agregado de CaCl₂, lo cual permitió evaluar el efecto de los iones Ca⁺² sobre la elución del FIXr.

Se siguió el procedimiento cromatográfico de la cromatografía 1.

Soluciones buffer utilizadas:

- Buffer de equilibrio: Tris-HCl 50 mM; arginina 1 % (V/V) y lisina 1 % (V/V) (ambos aa al 1 % (V/V)); pH 7,4.
- Buffer de elevada fuerza iónica + CaCl₂: Tris-HCl 50 mM; NaCl 1M; arginina y lisina (ambos aa al 1 % (V/V)); CaCl₂ 20 mM; pH 7,4.

C) Cromatografía 3: gradiente de CaCl_2

Con el fin de encontrar la concentración óptima de CaCl_2 en la composición del buffer de elución se realizó una cromatografía en gradiente de concentración del mismo desde 0 a 20 mM utilizando 20 volúmenes de columna. Previo al inicio del gradiente se realizaron lavados a 15 y 24 $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ (lavado 1 y 2 respectivamente), necesarios para eliminar las impurezas de manera progresiva y evitar así un cambio brusco de la conductividad de la resina cromatográfica, lo que provocaría que al eliminarse rápidamente las impurezas arrastre consigo también una porción de FIXr unido a la misma, los lavados se dieron por finalizados al observar en el cromatograma ausencia de proteínas, medidas por absorbancia (UV).

Se recolectaron y analizaron las diferentes fracciones tal como se explicó para las cromatografías anteriores.

Soluciones buffer utilizadas:

- *Buffer de equilibrio: Tris-HCl 50 mM; arginina 1 % (V/V) y lisina 1 % (V/V); pH 7,4.
- *Buffer de lavado: Tris-HCl 50 mM; NaCl 1M; arginina y lisina (ambos al 1 % (V/V)); pH 7,4.
- Buffer para el gradiente de elución: Tris-HCL 50mM; CaCl_2 20 mM; arginina y lisina (ambos al 1 % (V/V)); pH 7,4.

*Se realizaron combinaciones del buffer de equilibrio y de lavado para obtener las diferentes conductividades de los lavados.

6.11.2 Purificación del FIXr producido por un clon celular estable

Se realizó la purificación cromatográfica del FIXr obtenido en el sobrenadante de un cultivo de un clon celular estable en medio de cultivo de selección conteniendo vitamina K3 (200 nM), MTX (20 nM) y SFBd al 10 % (V/V). Se empleó una placa de cultivo de 10 cm.

Luego de 48 h de cultivo celular se cosechó el sobrenadante y se centrifugó, el sobrenadante obtenido se conservó a 4 °C hasta su purificación.

Protocolo de purificación:

3. Equilibrado: la columna se equilibró con 5 volúmenes de columna de buffer de equilibrio.
4. Siembra: se acondicionó la muestra filtrándola por membrana de 0,22 μm (Sartorius) y se sembró en la columna de purificación.
5. *Lavados: se realizaron tres lavados a 10, 15 y 24 $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$
6. Elución 1: se eluyó el FIXr con buffer de elución 1.
7. Elución 2: para eluir el FIXr remanente y las impurezas más afines a la resina se utilizó buffer de elución 2.

Durante la cromatografía se colectaron fracciones a las que se les determinó actividad biológica y proteínas totales. A su vez, alícuotas de dichas fracciones se conservaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior análisis por western blot.

Soluciones buffer utilizadas:

- *Buffer de equilibrio: Tris-HCl 50 mM; arginina 1 % (V/V) y lisina 1 % (V/V); pH 7,4.
- *Buffer de lavado: Tris-HCl 50 mM; NaCl 1 M; arginina y lisina (ambos al 1 % (V/V)); pH 7,4.
- Buffer de elución 1: Tris-HCl 50 mM; arginina y lisina (ambos al 1 % (V/V)); Ca_2Cl 15 mM; pH 7,4.
- Buffer de elución 2: Tris-HCl 50 mM; NaCl 0,3 M; arginina y lisina (ambos al 1 % (V/V)); Ca_2Cl 15 mM; pH 7,4.

*Se realizaron combinaciones del buffer de equilibrio y de lavado para obtener las diferentes conductividades de los lavados.

6.11.3 Parámetros evaluadores de la eficiencia de la purificación cromatográfica de FIXr

Luego de cada proceso cromatográfico se evaluó la eficiencia de la purificación de acuerdo a los siguientes parámetros:

- Actividad específica (AE):

Cociente entre la Actividad Biológica (AB) de FIXr en UI.ml⁻¹ y la concentración de proteínas totales (CPT) en mg.ml⁻¹ de la muestra.

$$AE = AB/CPT \text{ (UI.mg-1)}$$

- Factor de purificación (FP):

Cociente entre la AE de la muestra luego del proceso de purificación (AEf) y la AE la muestra previa al proceso de purificación (AEi).

$$FP = AEf/AEi$$

- Unidades totales (UIt):

Valor de AB de FIXr multiplicado por el volumen de muestra (vol) en mL.

$$UIt = AB \times vol$$

- Rendimiento (R):

Cociente entre las UItde FIXr luego de la purificación (UItf) y las UIt iniciales antes de la purificación (UIti), multiplicado por cien.

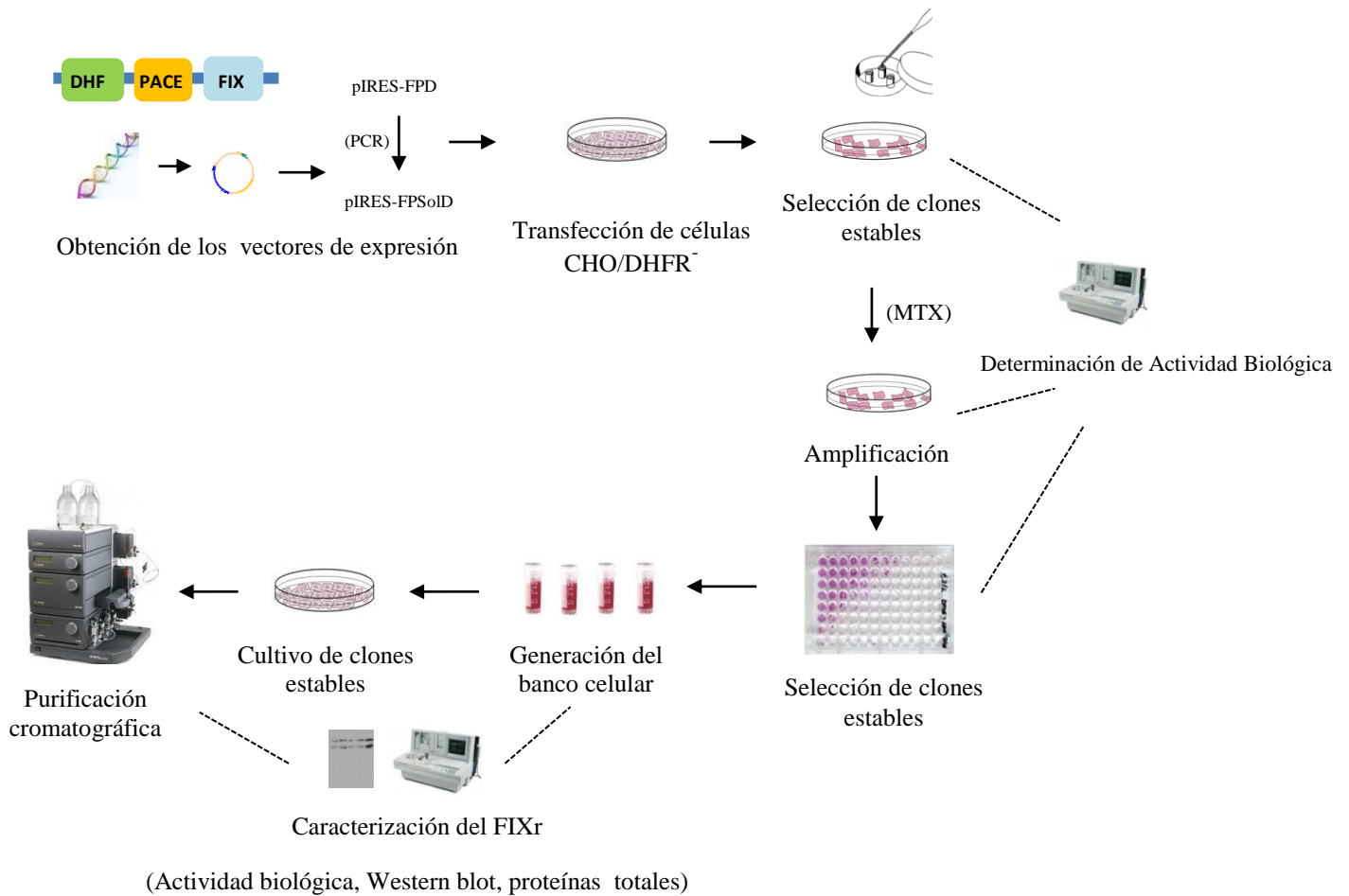
$$R = UItf/UIti \times 100$$

5.12 FÁRMACO DE REFERENCIA

Durante las diferentes etapas de caracterización del FIXr y de optimización de la purificación de FIXr se utilizó como referencia el fármaco recombinante de origen comercial liofilizado BeneFIX (Pfizer).

5.13 RESUMEN EXPERIMENTAL

A continuación se describe esquemáticamente las etapas experimentales involucradas en el presente trabajo de Tesis de Maestría.



6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 DISEÑO Y OBTENCIÓN DE VECTORES DE EXPRESIÓN

7.1.1 Diseño de vectores de expresión

Como se comentó en la sección 6.4, se emplearon dos estrategias de clonado tomando como base el vector comercial pIRES.

La primera estrategia se basó en la síntesis de un vector “ad-hoc” que posea las secuencias codificantes de FIX, PACE y DHFR (Fig. 13A), el cual se solicitó a una empresa especializada. De esta manera se obtuvo el vector pIRES-FPD de 9,7 Kb permitiendo la expresión en células CHO de los tres genes a la vez.

La segunda estrategia consistió en modificar por PCR la construcción pIRES-FPD de manera de obtener una construcción que exprese la enzima PACESol en remplazo de la enzima PACE de membrana (Fig. 13B).

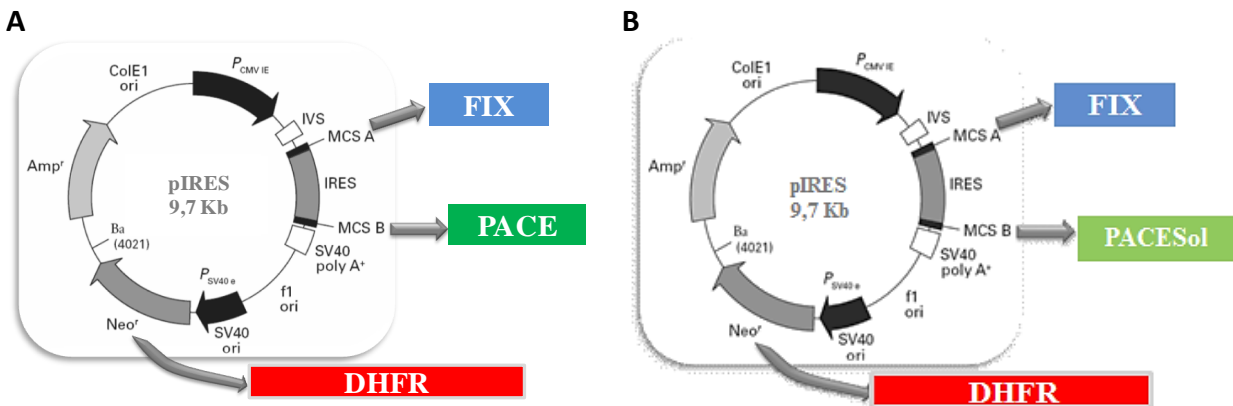


Figura 13: Esquema de los vectores empleados (ya mostrados en la sección 6.4.1) para las diferentes estrategias.

A) pIRES-FPD “ad-hoc”. B) pIRES-FPSolD.

6.2 TRANSFECCIÓN Y EXPRESIÓN DE FIXr

7.2.1 Evaluación de la expresión de FIXr en células transfectadas de forma transiente

Se determinó la expresión de FIXr en células CHO/DHRF⁻ realizando transfecciones transientes (Tt) con las construcciones diseñadas (pIRES-FPD y pIRES-FPSolD) utilizando la técnica de lípidos catiónicos (sección 6.5). Se incluyó un control negativo de transfección (transfección de células CHO/DHRF⁻ en ausencia del vector). Todas las transfecciones se realizaron por duplicado.

Se tomaron muestras de los sobrenadantes de los cultivos 48 h post transfección, a las cuales se les determinó actividad biológica por coagulometría (sección 6.8). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Valores de actividad biológica (AB) de FIXr obtenidas en los sobrenadantes de cultivo de células transfectadas. Los valores son promedios de actividad biológica de duplicados, los cuales a su vez se determinaron por triplicado (\pm desviación estándar).

Muestras	AB (mUI.mL ⁻¹) \pm DE
Tt1 (pIRES-FPD)	19,3 \pm 4,0
Tt2 (pIRES-FPSolD)	38,2 \pm 7,9
Control negativo de Tt	0,0 \pm 0,0

Como se puede observar en la Tabla 2, en todos los sobrenadantes de las células transfectadas con las construcciones mencionadas fue posible cuantificar la actividad biológica del FIX, logrando de esta manera demostrar la expresión de FIXr con actividad biológica por parte de las células CHO/DHRF⁻ transfectadas. Como detalle, también se puede observar una mayor actividad biológica del FIXr producido utilizando la construcción pIRES-FPSolD.

7.2.2 Obtención y selección de clones celulares estables.

Con la finalidad de obtener líneas celulares estables productoras de FIXr, se llevó a cabo transfecciones estables (sección 6.5.2) con las construcciones antes mencionadas.

Las transfecciones se realizaron por duplicado, las colonias celulares formadas se seleccionaron utilizando cilindros de clonado (sección 6.6.1). Por cada placa se obtuvieron entre 15 y 21 colonias. Estas fueron evaluadas por actividad biológica de FIXr en mUI.mL⁻¹ producido.

Los resultados mostraron, tal como ocurrió en las células transfectadas en forma transiente, una mayor actividad biológica de FIXr en los clones celulares estables obtenidos por medio de la transfección con la construcción que posee el gen de la enzima PACESol en comparación de aquellos obtenidos con la construcción que posee el gen de la enzima PACE completa (Fig. 14).

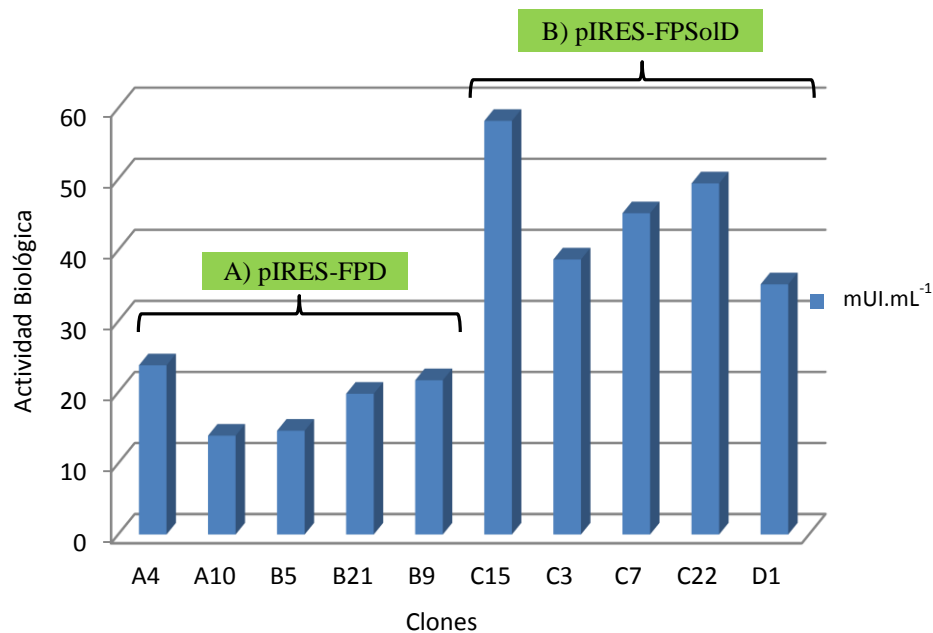


Figura 14: Comparación de los valores de actividad biológica hallados en los sobrenadantes de los cultivos de los cinco mejores clones celulares estables obtenidos con cada una de las construcciones. A) pIRES-FPD. Valor promedio: 18,8 mUI.mL⁻¹; DE: 3,6; CV %: 19,2 y B) pIRES-FPSolD. Valor promedio: 45,3 mUI.mL⁻¹; DE: 6,8; CV %: 14,9. Los valores de actividad biológica de cada uno de los clones se determinaron por triplicado.

Esta mayor actividad biológica de FIXr por parte de los clones que expresan la enzima PACESol (produjeron un 59% más de actividad biológica de FIXr comparado con las células que expresan la PACE nativa), esta diferencia se puede deber a que la enzima PACESol posee un tránsito intracelular más lento que la enzima nativa, haciendo más eficiente el procesamiento proteolítico de factores γ -carboxilados dependientes de vitamina K, a su vez se ha demostrado que específicamente para el FIXr dicha enzima continua con su actividad enzimática en el medio extracelular, aumentando así su capacidad de procesamiento (Rehmtulla et al. 1992; L. C. Wasley et al. 1993).

Los clones celulares estables que producían una actividad biológica de FIXr mayor a 30 mU.mL⁻¹ fueron seleccionados para avanzar hacia la etapa de amplificación génica.

6.3 AMPLIFICACIÓN GÉNICA

El método de amplificación génica del gen transfectado consiste en ejercer presión selectiva de clones celulares por el agregado a los medios de cultivo de cantidades crecientes de MTX. Según se explicó en la sección 6.7 esta droga es un inhibidor competitivo de la enzima DHFR, presente en el plásmido de expresión utilizado.

La concentración inicial de MTX agregado a los medios de cultivo fue de 20 nM, la cual se incrementó gradualmente hasta llegar a una concentración de 500 nM.

Durante la presión selectiva observamos que a medida que aumenta la concentración de MTX en los cultivos se incrementa la actividad biológica de FIX en los diferentes clones celulares, esto ocurre hasta un valor límite de actividad biológica próximo a 1UI.mL⁻¹ (Tabla 3), por ejemplo el clon C3 a concentración de 20 nM de MTX expresó 1,08 UI.mL⁻¹ de FIX y a una concentración de 50 nM la actividad biológica del FIX producido fue de 0,95 UI.mL⁻¹. Este valor límite de actividad biológica podría ser consecuencia de la saturación de la capacidad de procesamiento de las células para llevar a cabo modificaciones postraduccionales cuando el FIXr se expresa en altos niveles (Kaufman et al. 1986; Louise C. Wasley et al. 1993).

Tabla 3: Valores de actividad biológica (AB) de FIXr obtenidas en los sobrenadantes de cultivo de los clones celulares tratados con diferentes concentraciones de MTX.

Clon	Sin MTX	20 nM MTX	50 nM MTX	200 nM MTX	500 nM MTX
C3	(0,06 ± 0,01)*	(1,08 ± 0,07)*	(0,95 ± 0,11)*	ND	ND
C7	(0,04 ± 0,01)*	(0,57 ± 0,09)*	**	ND	ND
C15	(0,05 ± 0,01)*	(0,25 ± 0,04)*	(0,87 ± 0,03)*	(0,60 ± 0,05)*	ND
C22	(0,05 ± 0,01)*	(0,80 ± 0,10)*	(0,93 ± 0,07)*	(1,10 ± 0,09)*	(0,93 ± 0,11)*
D1	(0,04 ± 0,01)*	(0,34 ± 0,11)*	(1,05 ± 0,12)*	**	ND

*Actividad biológica (UI.mL⁻¹). **_Indican la concentración de MTX a la cual los clones celulares no sobrevivieron. Los valores de AB se determinaron por triplicado, se expresan con su promedio y correspondiente desviación estándar.

A su vez, se observó que los clones celulares presentaron diferente resistencia al MTX ya que a partir de cierta concentración del mismo comienza a tener efecto letal, a modo de ejemplo

vemos que el clon C7 a una concentración de 20 nM de MTX logró expresar FIXr con actividad biológica, pero no resistió una concentración mayor de MTX (50 nM).

También se observó que los valores de actividad biológica de FIXr obtenidos entre los diferentes clones celulares son muy dispares, esto puede depender de varios factores, la diferente resistencia al MTX de cada uno de los clones celulares, el número de copias de FIX que se integraron al genoma celular, el lugar del genoma donde se incorporaron las copias del gen del FIX, ya que la integración en heterocromatina inactiva da como resultado poca o ninguna expresión transgénica, mientras que la integración en eucromatina activa permite una mayor expresión (Jayapal et al. 2007; Richards and Elgin 2002; Wurm 2004).

Se seleccionaron los clones celulares que producían una actividad biológica ($UI \cdot mL^{-1}$) de FIXr cercana a la unidad y en los cuales la concentración final de MTX a agregar al medio de cultivo de selección fue la más baja posible, teniendo en cuenta la toxicidad inherente del MTX. Con dichos clones se realizó el clonado celular final por el método de dilución límite. Luego de dicho proceso se obtuvieron por placa multipozo entre 4 a 6 clones con diferente actividad biológica de los cuales se seleccionaron los clones más productores, y que a su vez poseían morfología y crecimiento adecuado, conformando con ellos el banco celular, el cual se almacenó en nitrógeno líquido a $-196\text{ }^{\circ}C$. Dichos clones celulares fueron caracterizados por su actividad específica y por la actividad de FIXr producido por millón de células por día de cultivo.

Para realizar la caracterización se descongeló un criotubo del banco celular de cada uno de los clones celulares y se los cultivó en placas, sembrando en las mismas 10^6 células. mL^{-1} . Se utilizó medio de cultivo de selección suplementado con SFBd al 10 % (V/V); vitamina K3 200 nM y a la concentración de MTX correspondiente para cada clon. Transcurridas 48 h de cultivo se realizó la cosecha de las células y se determinó actividad biológica y concentración de proteínas totales en los sobrenadantes, con dichos valores se calculó la actividad específica (Tabla 4). Al mismo tiempo se realizó el recuento celular, con el cual se calculó la cantidad de UI de FIXr producido por millón de células (10^6 células) y por día de cultivo (d):

$$UI \text{ FIXr} \times (10^6 \text{ células})^{-1} \times d^{-1} = \text{FIXr} (UI \cdot mL^{-1}) \times \left(\frac{\text{millón de células}}{mL} \right)^{-1} \times \text{día}^{-1}$$

Tabla 4: Valores de actividad específica (AE) y UI de FIXr expresado por millón de células por día de cultivo, las determinaciones se realizaron por triplicado.

Clon	AE (UI.mg ⁻¹) ± DE	UI FIXr x (10 ⁶ células) ⁻¹ x d ⁻¹ ± DE
C3/D9	0,236 ± 0,052	0,132 ± 0,013
C7/F3	0,201 ± 0,032	0,119 ± 0,025
C15/H2	0,175 ± 0,040	0,113 ± 0,019
C22/E7	0,226 ± 0,017	0,130 ± 0,019
D1/G6	0,188 ± 0,030	0,112 ± 0,022

Se realizó la detección inmunológica por western blot del FIXr obtenido en los sobrenadantes de cultivo de los clones celulares seleccionados. Para ello se descongeló un criotubo del banco celular de cada uno de los clones celulares y se cultivaron de la misma manera que en el caso anterior, solo que en esta oportunidad el medio de cultivo de selección se suplementó con SFBd al 0,1 % (V/V) y no al 10 % (V/V), esta disminución en la concentración de SFBd se debe a que uno de los principales componentes del mismo es la albúmina, donde su concentración oscila entre los 20 y 36 ug.µL⁻¹ (Lindl 2002). La albúmina dificulta la detección del FIXr por SDS-PAGE ya que su movilidad electroforética relativa es similar a la del FIXr y en el caso del western blot provoca un “arrastre” de este dando como resultado una membrana con mucho *background* al ser revelada.

Transcurridas 48 h de cultivo se tomó el sobrenadante y analizó por western blot, el resultado del mismo muestra que todos los clones celulares estables (carril 1 a 5, Fig. 15B) poseen una banda inmunológicamente positiva compatible con la presencia de FIXr, 70 KDa (flecha negra) coincidiendo con la marca inmunológica detectada para el C+ (BeneFIX). Se observa otra banda a la altura aproximada de 55 KDa (flecha azul), la cual correspondería a diferentes isoformas del FIXr que se producen durante el cultivo de células con distinto perfil de γ -carboxilación y/o heterogeneidad en la glicosilación provocado por la sobreexpresión de FIXr lo cual satura la capacidad de las células para llevar a cabo estas modificaciones postraduccionales (Kaufman et al. 1986; Louise C. Wasley et al. 1993).

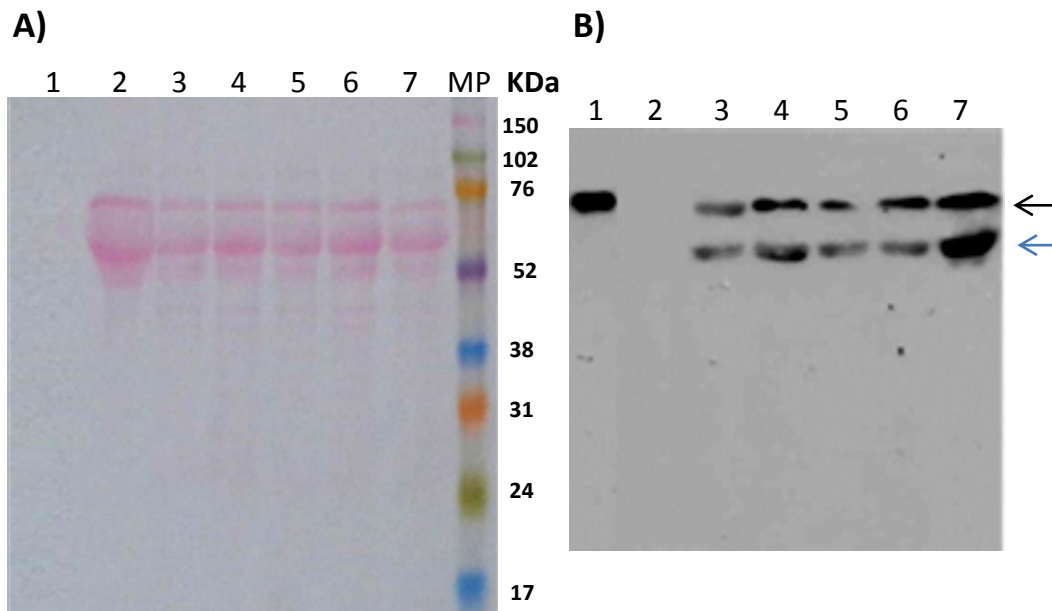


Figura 15: Sobrenadantes de cultivo de células CHO/DHFR^r. 1) BeneFIX (500ng) (control positivo); 2) células sin transfectar (control negativo); 3-7) células transfectadas con el vector pIRES-FPSolD: clones D1/G6, C22/E7, C15/H2, C7/F3 y C3/D9 respectivamente. Siembra: 1 mgul⁻¹. A) Membranas teñidas con solución de rojo *Ponceau* (Sigma). B) Membranas reveladas con anticuerpo anti-FIX y por reacción de quimioluminiscencia. MP: Marcador de peso molecular (Rainbow™, GE Healthcare). Anticuerpo primario *mouse*: anti-FIX (abcam); Anticuerpo secundario *goat*: anti *mouse* IgG-HRP (abcam).

6.4 PURIFICACIÓN CROMATOGRÁFICA DE FIXr

1. Evaluación de las condiciones de lavado y elución cromatográfica en columna de *Q-Sepharose*

Se realizó la optimización de la purificación de FIXr a escala laboratorio mediante cromatografía en columna con una resina de intercambio aniónico fuerte *Q-Sepharose* utilizando la proteína comercial de referencia (BeneFIX). Las tres corridas cromatográficas que se describen a continuación fueron no secuenciales en las cuales el material sembrado fue en cada caso la proteína comercial de referencia diluida en la cantidad adecuada de medio de cultivo de selección.

A) Cromatografía 1: gradiente de fuerza iónica

En el inicio de la cromatografía se observó un pico proteico (fracciones 2 a 4, Fig.16) detectado por aumento de la absorbancia (mAU), el cual se debe a la fracción de muestra no retenida en la columna (excluido). Durante el gradiente de fuerza iónica (de 0 a 50 mScm⁻¹, para más detalle ver sección 6.11.1.A) se observó que a medida que se incrementaba la conductividad (mScm⁻¹) de la solución buffer que ingresaba a la columna se producía la elución de otro pico proteico (fracciones 14 a 24).

El análisis por coagulometría de las distintas fracciones colectadas durante la cromatografía indicó la presencia de FIXr solo en aquellas fracciones cuyas conductividades oscilaron entre 29 y 37 mScm⁻¹ (fracciones 25 a 28, sombreado celeste Fig. 16).

La ausencia de actividad biológica en los 2 picos de absorbancia detectados (uno correspondiente al excluido y el otro al gradiente de fuerza iónica) indicó la presencia en dichos picos de proteínas diferentes al FIXr (componentes del medio de cultivo) o FIXr sin actividad biológica, al mismo tiempo la ausencia de actividad biológica en las fracciones del excluido demostró que la totalidad o mayoría del FIXr con actividad biológica sembrado en columna se unió a la matriz cromatográfica.

Finalmente, se calculó el factor de purificación (relación entre la actividad específica de la muestra purificada y la actividad específica del material de partida) y el rendimiento de la cromatografía (relación porcentual entre las UI totales obtenidas en la muestra purificada y las UI totales del material de partida), obteniendo un rendimiento del 80 % y un factor de purificación de 20,5 lo que equivale a un incremento de la actividad específica de 20,5 veces (Tabla 5).

Tabla 5: Valores de actividad específica (AE) y UI totales (UI_t) de FIXr con sus respectivas desviaciones estándar (DS) obtenidos en el material de partida y la muestra purificada (fracciones 25 a 28). Se detallan valores de Factor de Purificación (FP) y Rendimiento % (R %).

	AE ± DE (UI.mg ⁻¹)	UI _t ± DE
Material de partida	(1,33 ± 0,12)	16,23 ± 0,85
Muestra purificada	(27,25 ± 1,71)	13,01 ± 0,62
FP	20,5	-
R %	-	80

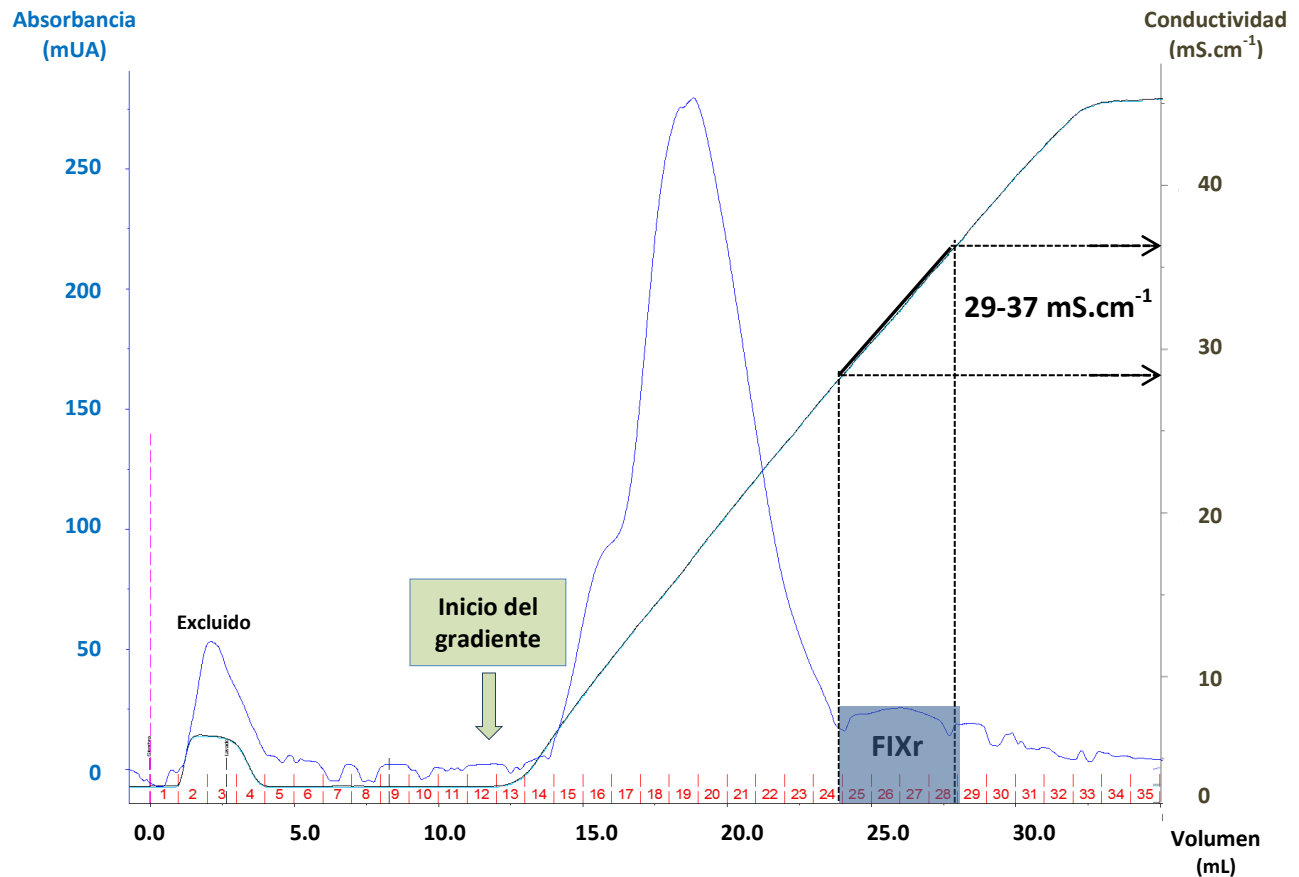


Figura 16: Cromatograma obtenido luego de aplicar un gradiente de fuerza iónica creciente. La elución de FIXr con actividad biológica se indica con un sombreado celeste, entre las conductividades de 29 y 37 $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Fracciones 25 a 28). Los números del 1 al 35 indican las fracciones colectadas durante toda la cromatografía para su posterior análisis. Las condiciones cromatográficas se describen en la sección 6.11.1.A.

B) Cromatografía 2: gradiente de fuerza iónica + CaCl_2

De manera similar a la cromatografía 1, se observó un pico proteico en el material no retenido en la columna (excluido) y a medida que se incrementaba la conductividad (0 a $50 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$) de la solución buffer que ingresaba a la columna se producía la elución de otro pico proteico entre las conductividades 15 y $23 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ (fracciones 17 a 20, Fig.17). La determinación de la actividad biológica indicó la presencia de FIXr sólo en el pico eluido de la columna entre las fracciones 17 a 20 (indicado con un sombreado celeste, Fig. 17).

A diferencia de la cromatografía 1, donde el FIXr con actividad biológica comenzaba a eluir a los $29 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ de conductividad, en este caso comenzó a eluir a una conductividad de $15 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$, esto demostró el efecto que causan los iones Ca^{+2} (los cuales se encontraban presentes en la

solución buffer utilizada para realizar el gradiente, para detalles de su composición ver sección 6.11.1.B), sobre la afinidad relativa del FIXr a la matriz cromatográfica, como se explicó en la sección 6.11.1.B los iones Ca^{+2} inducen un cambio conformacional en la estructura molecular de FIXr, lo cual resultó en una elución del FIXr a fuerzas iónicas bajas lo que provocó que eluya junto con la mayoría de la proteína presente en el medio de cultivo dando como resultado un bajo factor de purificación (FP: 1,5; Tabla 6).

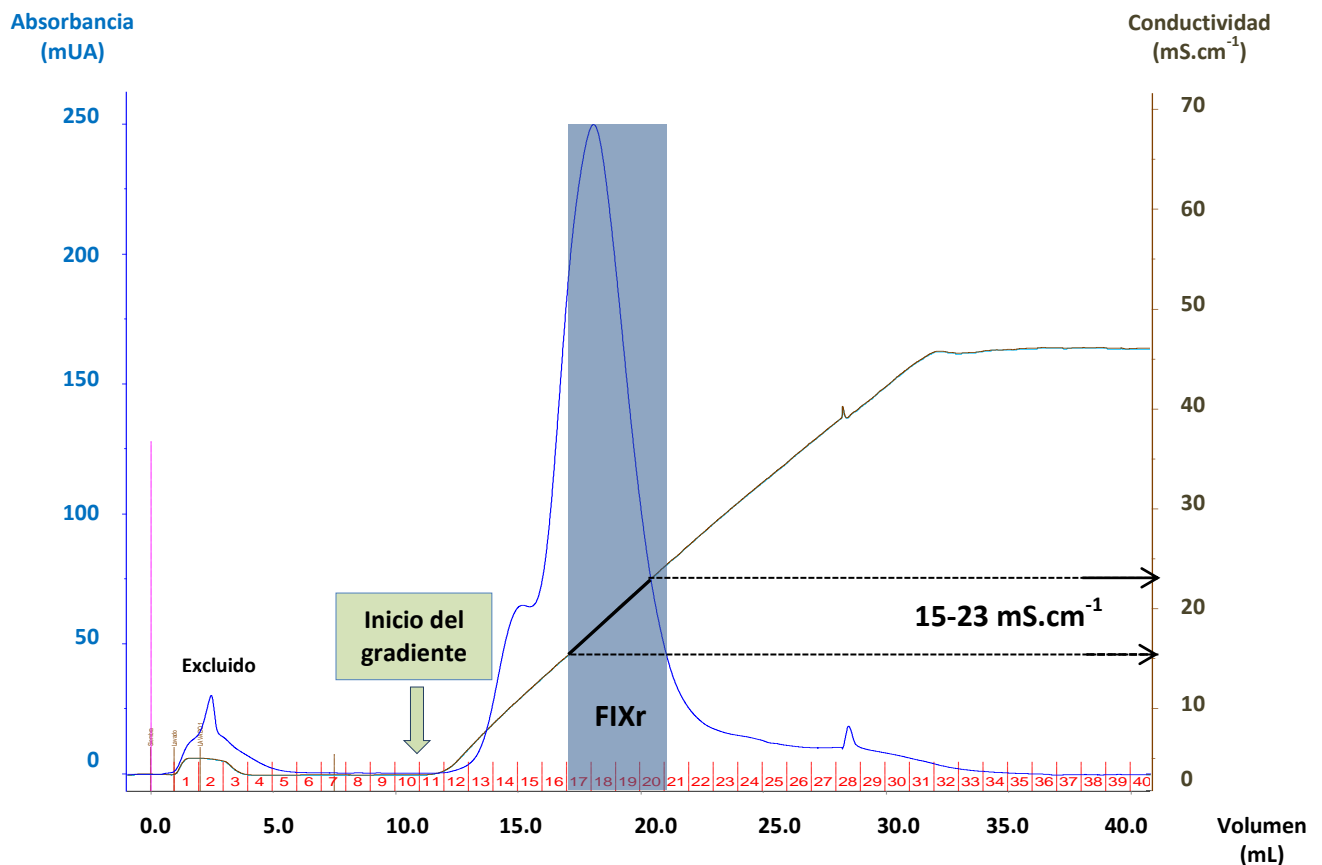


Figura 17: Cromatograma obtenido luego de aplicado el gradiente de fuerza iónica creciente más iones CaCl_2 . La elución de FIXr con actividad biológica se indica con un sombreado celeste, entre las conductividades de 15 y 23 mS.cm^{-1} (fracciones 17 a 20). Los números del 1 al 40 indican las fracciones colectadas durante toda la cromatografía para su posterior análisis. Las condiciones cromatográficas se describen en la sección 6.11.1.B.

Tabla 6: Valores de actividad específica (AE) y UI totales (UI_t) de FIXr con sus respectivas desviaciones estándar (DS) obtenidos en el material de partida y la muestra purificada (fracciones 17 a 20). Se detallan valores de Factor de Purificación (FP) y Rendimiento % (R %).

	AE ± DE (UI.mg ⁻¹)	UI _t ± DE
Material de partida	(0,95 ± 0,19)	15,84 ± 1,22
Muestra purificada	(1,40 ± 0,21)	11,89 ± 1,03
FP	1,5	-
R %	-	75

C) Cromatografía 3: gradiente de CaCl₂

Para permitir la eliminación de impurezas, previo al comienzo del gradiente de CaCl₂, se realizaron 2 lavados (para más detalles ver sección 6.11.1.C).

El análisis por coagulometría de las fracciones colectadas durante la cromatografía indicó que la totalidad del FIXr biológicamente activo eluyó entre las concentraciones de 8 a 13 mM de CaCl₂ (sombreado celeste, Fig. 18). En este caso el rendimiento obtenido fue del 75% y el factor de purificación de la cromatografía fue de 21 (Tabla 7), este último valor fue mayor al obtenido en la cromatografía 2 y similar al obtenido en la cromatografía 1.

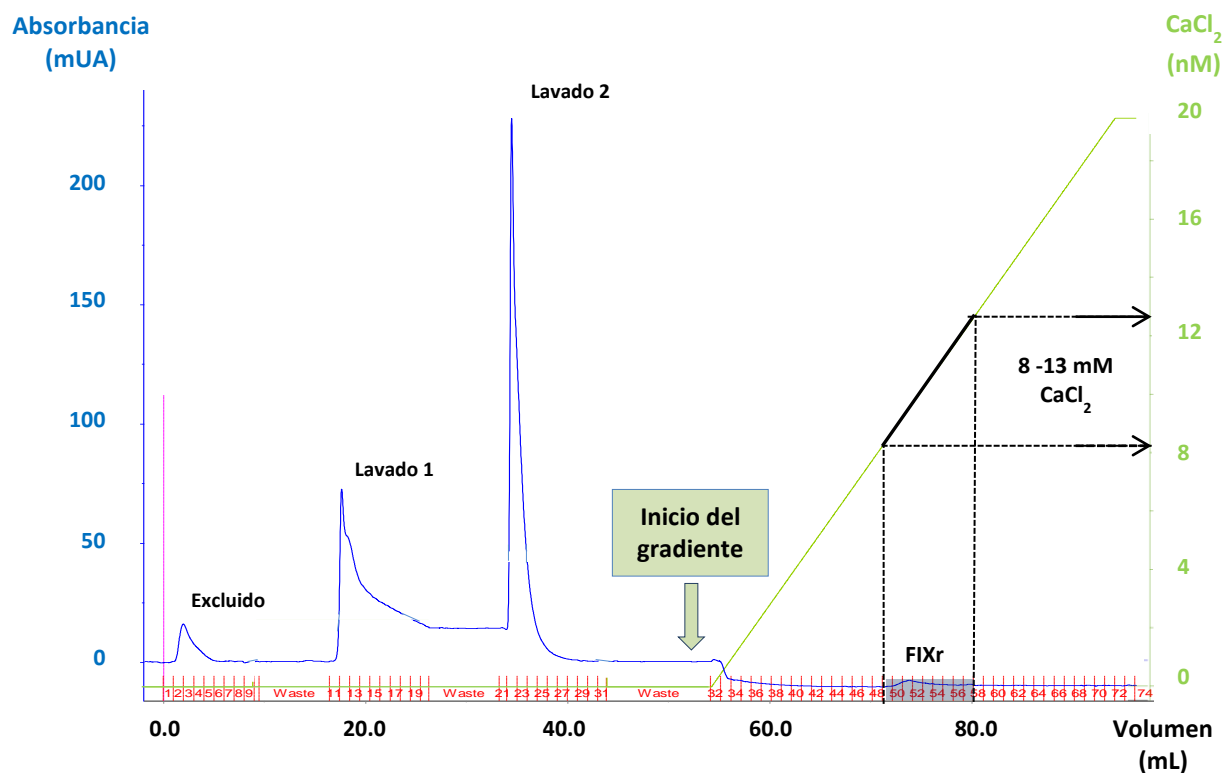


Figura 18: Cromatograma obtenido luego de aplicado el gradiente de CaCl₂. La elución de FIXr con actividad biológica se indica con un sombreado celeste, entre las concentraciones aproximadas de 8,5 a 13 mM de CaCl₂. Las condiciones cromatográficas se describen en la sección 6.11.1.C.

Tabla 7: Valores de actividad específica (AE) y UI totales (UIt) de FIXr con sus respectivas desviaciones estándar (DS) obtenidos en el material de partida y la muestra purificada. Se detallan valores de Factor de Purificación (FP) y Rendimiento % (R %).

	AE \pm DE (UI.mg ⁻¹)	UIt \pm DE
Material de partida	(1,10 \pm 0,30)	16,42 \pm 1,28
Muestra purificada	(23,10 \pm 1,44)	12,45 \pm 2,14
FP	21,0	-
R %	-	76

Los rendimientos obtenidos en las 3 cromatografías realizadas fueron similares (entre el 75 y el 80 %, Fig.19). Lo mismo ocurre con el factor de purificación (FP: 20,5 y 21,0) entre las cromatografías 1 y 3, gradiente de fuerza iónica y de CaCl₂ respectivamente, pero dicho coeficiente fue mucho menor (FP: 1,5) en la cromatografía 2 (gradiente de fuerza iónica + CaCl₂).

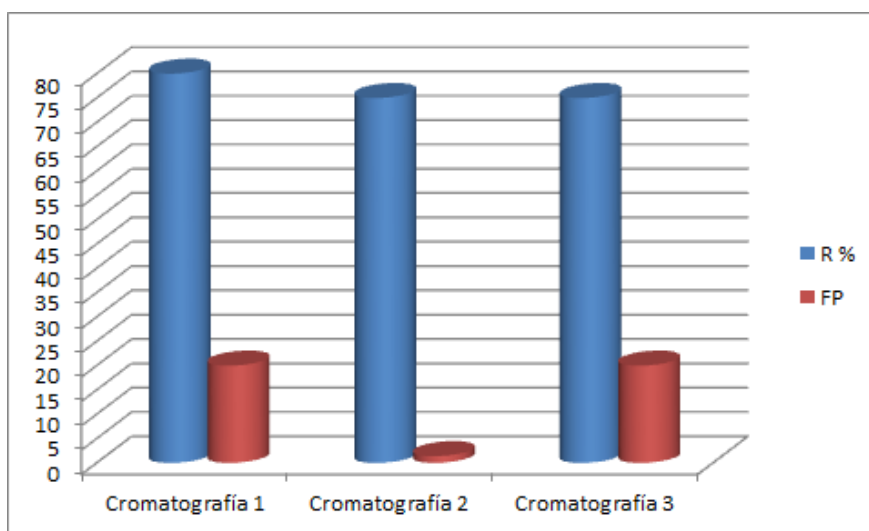


Figura 19: Comparación del rendimiento (R%) y el factor de purificación (FP) obtenidos en las 3 cromatografías realizadas para la puesta a punto de la purificación de FIXr utilizando la matriz cromatográfica de intercambio aniónico fuerte *Q-Sepharose*. Material de partida: BeneFIX diluido en medio de cultivo de selección suplementado con SFBd al 10 % (V/V).

Los resultados indican que entre las condiciones experimentales analizadas la mejor opción para eluir el FIXr con actividad biológica desde la matriz cromatográfica es utilizar un buffer cuya conductividad sea próxima a 29 mS.cm⁻¹, ya que con ella se obtuvieron los mejores resultados en cuanto a recuperación y factor de purificación del FIXr con actividad biológica. Sin embargo,

cabe recordar que la optimización de la cromatografía de purificación de FIXr se realizó con un FIXr comercial puro (BeneFIX) el cual fue diluido en medio de cultivo de selección con SFBd al 10 % (v/v) para simular la matriz del sobrenadante del cultivo celular de los clones estables. El análisis por la técnica de western blot del producto comercial mostró una única banda específica de FIXr con una movilidad electroforética de 70 KDa, en cambio para los sobrenadantes de los clones celulares estables se observó 2 bandas inmunoreactivas específicas de FIXr, una con una movilidad electroforética similar al producto de referencia y otra aproximadamente a la altura de los 55 KDa, esta última correspondería a una isoforma de FIXr biológicamente inactiva. Por lo tanto utilizar un buffer con una conductividad cercana a 29 mS.cm^{-1} para eluir el FIXr producido por los clones celulares provocaría una disminución de la actividad específica del producto purificado porque a dicha conductividad se eluye tanto el FIXr con actividad biológica como el FIXr sin actividad biológica, de esta manera la mejor opción para eluir el FIXr con actividad biológica es utilizar un buffer con baja conductividad y con el agregado de iones Ca^{+2} que permita eluir el FIXr solo por afinidad. La concentración óptima de CaCl_2 a utilizar durante el proceso de purificación es 15 mM, ya que a dicha concentración se asegura la completa elución del FIXr (Fig. 18). Esta concentración además es lo suficientemente baja como para evitar interferencias durante la determinación de actividad biológica (la concentración de CaCl_2 utilizada para realizar la medición es de 25 mM según se indicó en la sección 6.8).

En conclusión se definieron las siguientes condiciones de lavado y elución de la cromatografía de purificación del FIXr utilizando la resina de *Q-Sepharose*:

- ✓ Realizar 3 lavados a conductividades crecientes: 10 mS.cm^{-1} , 15 mS.cm^{-1} y 24 mS.cm^{-1} . El primer y segundo lavado de baja fuerza iónica para eliminar las impurezas de menor afinidad a la resina de manera progresiva y el tercer lavado a una fuerza iónica mayor para eliminarlas impurezas más afines a *la Q-Sepharose*, pero lo suficientemente baja para no permitir la elución del FIXr.
- ✓ Eluir el FIXr por afinidad, utilizando un buffer de baja fuerza iónica (15 mS.cm^{-1}) conteniendo CaCl_2 en una concentración de 15 mM.

2. Purificación cromatográfica del FIXr producido por un clon celular estable.

Para la purificación de FIXr con *Q-Sepharose* se siguió el protocolo definido en la sección 6.11.2 (acondicionamiento de la muestra, lavados y elución).

En esta cromatografía, en particular se realizaron 2 eluciones (Fig. 20), una igual a la establecida previamente (elución 1) y otra a mayor fuerza iónica (elución 2), (buffer de conductividad 30 mS.cm⁻¹), a fin de asegurar la completa elución del FIXr remanente (con o sin actividad biológica, según se explicó anteriormente) que haya quedado unido a la resina luego de la primera elución, como así también de las proteínas más afines a la *Q-Sepharose*.

El análisis por coagulometría indicó que en el pico principal de elución 1 (realizado por afinidad) la recuperación de FIXr con actividad biológica fue superior al 90 % con un elevado factor de purificación (FP: 128,9). Por otra parte tanto en el excluido como en los lavados la actividad biológica de FIXr fue nula. En el caso del pico de elución 2 se recuperó un 3 % del FIXr con actividad biológica (Tabla 8).

Tabla 8: Valores de actividad específica (AE) y UI totales (UIt) de FIXr con sus respectivas desviaciones estándar (DS) obtenidos en el material de partida y la muestra purificada (Elución 1) y la Elución 2. Se detallan valores de Factor de Purificación (FP) y Rendimiento % (R %).

	AE ± DE (UImg ⁻¹)	UIt ± DE	FP	R %
Material de partida	(0,22 ± 0,04)	7,73 ± 0,65	-	-
Elución 1	(28,35 ± 2,33)	7,03 ± 0,32	128,9	91
Elución 2	(0,01 ± 0,01)	0,20 ± 0,03	-	3

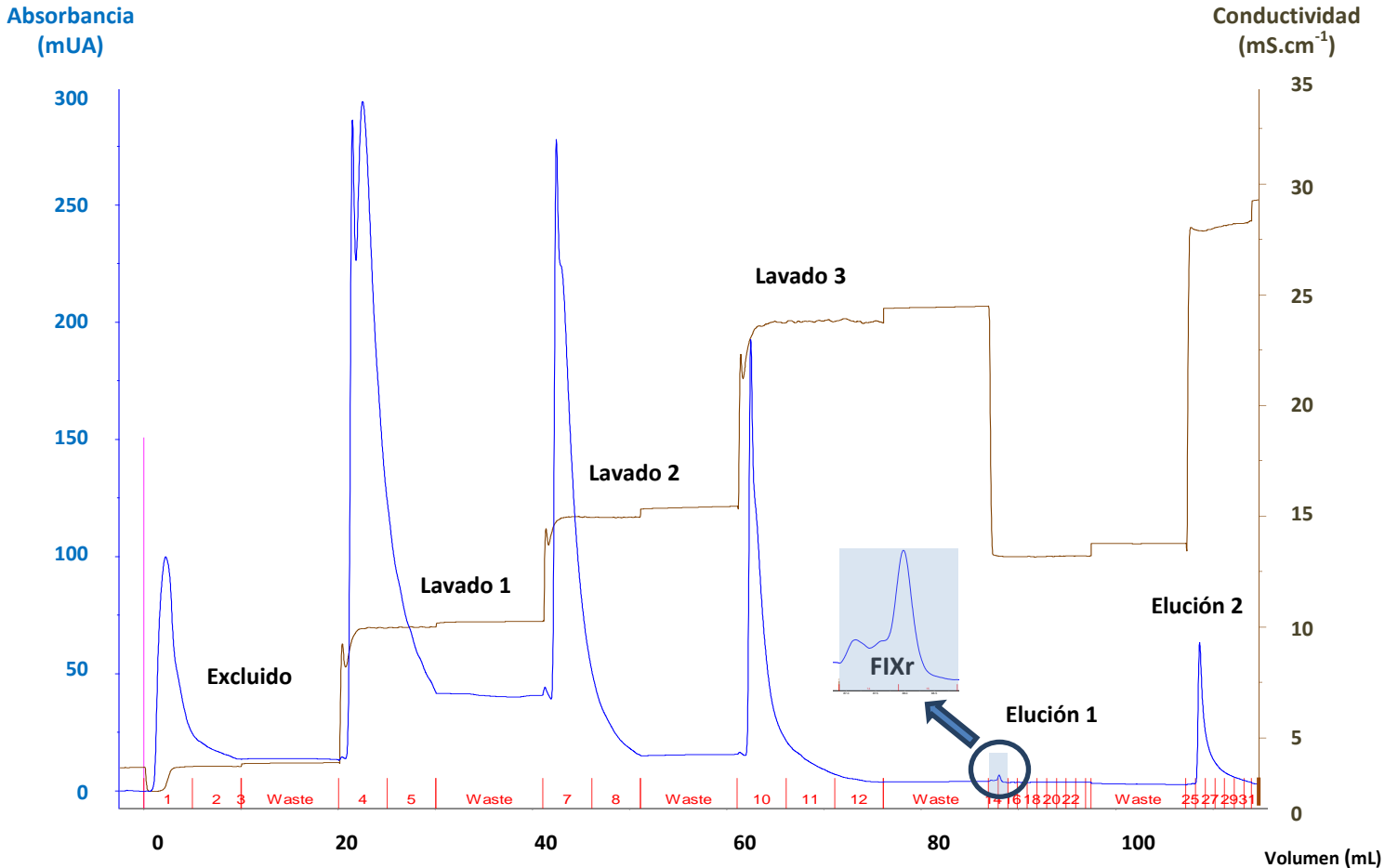


Figura 20: Cromatograma obtenido luego del proceso cromatográfico de purificación del FIXr producido por el clon C3/D9. Se detallan los picos de absorbancia correspondientes al Excluido, Lavado 1, Lavado 2, Lavado 3, Elución 2 y se señala el pico de elución 1 (producto purificado) con una flecha, se amplifica dicho pico para permitir una observación más clara del mismo. Las condiciones cromatográficas se describen en la sección 6.11.2.

El análisis por western blot del pico correspondiente a la elución 1 mostró una única banda específica de FIXr con una movilidad electroforética similar a la de la proteína comercial utilizada como referencia (70 KDa). En cuanto a la elución 2, se observaron 2 bandas específicas de FIXr, una banda de menor proporción a la misma altura que la correspondiente a la proteína de referencia y otra de mayor proporción con una movilidad relativa menor (aproximadamente 55 KDa), la cual correspondería, como ya se comentó anteriormente, a isoformas de FIXr sin actividad biológica (Fig. 21).

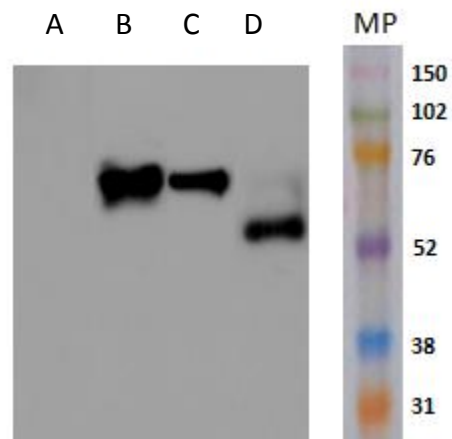


Figura 21: Western blot revelado por quimioluminiscencia. Muestras correspondientes al proceso de purificación del FIXr producido por un clon celular estable. Carriles: A) Lavado 3 (Conductividad: 24 mScm^{-1}); B) BeneFIX (1000 ng); C) Eluido 1 (Conductividad: 15 mScm^{-1} ; CaCl_2 : 15 mM); D) Eluido 2 (Conductividad: 30 mScm^{-1}). MP: Marcador de peso molecular (Rainbow™, GE Healthcare); Anticuerpo primario *mouse*: Anti FIX (abcam). Anticuerpo secundario *goat*: Anti *mouse*IgG-HRP (abcam). Siembra: 10 μl por carril.

7 CONCLUSIONES

La hemofilia B es un trastorno congénito o adquirido de la coagulación que causa hemorragias espontáneas o prolongadas debido a la deficiencia del FIX de la coagulación.

El tratamiento preventivo consiste en la terapia de reemplazo con concentrados de FIX, estos se obtienen en la industria farmacéutica mediante la purificación del plasma de donantes de sangre (FIXp) o por técnicas biología molecular (FIXr). La primera metodología tiene como limitación la disponibilidad de volúmenes importantes de materia prima y que a pesar de tratarse de sangre proveniente de donantes sanos, existe el riesgo potencial de contaminación biológica, especialmente de agentes infecciosos de origen viral. El empleo de células en cultivo para la producción de proteínas recombinantes de tercera generación elimina el riesgo de transmisión de agentes infecciosos ya que las mismas se cultivan en un medio libre de proteínas de origen humano o animal, constituyendo además una plataforma para su producción en masa sin limitación de materia prima.

La demanda nacional de FIX actualmente es de 22.8 millones de unidades de por año, de las cuales el 36 % corresponde a FIXr (World Federation of Hemophilia 2017).

En la Argentina la disponibilidad y accesibilidad del FIXr es limitada, ya que solo se comercializa un único fármaco de origen extranjero de costo elevado. La producción a nivel local de este tipo de biofármaco permitiría incrementar a futuro medicamentos esenciales para pacientes que padecen hemofilia B de una manera más accesible.

En este contexto se planteó la hipótesis del presente trabajo de Tesis, cuyo objetivo fue la obtención de FIXr utilizando como plataforma de producción células CHO, estas células cuentan con excelentes datos de seguridad acumulados durante décadas de producción de diferentes tipos de proteínas recombinantes comerciales, entre ellas factores de la coagulación (Jayapal et al. 2007), lo cual indudablemente facilitará el proceso de aprobación final por parte de la agencia reguladora correspondiente. Particularmente durante el presente trabajo se utilizó la línea celular CHO/DFRH⁻, la cual posee deletado el gen de la enzima DHFR.

Como primer paso se diseñaron y obtuvieron vectores de expresión a fin de expresar FIX y al mismo tiempo la enzima DHFR en cultivos de células CHO/DFRH⁻. Estos vectores se diseñaron para que también expresen PACE (pIRES-FPD) o su variante soluble PACESol (pIRES-FPSolD). Se

ha demostrado que tanto la variante salvaje como la soluble de dicha enzima escinde proteolíticamente dentro del aparato de Golgi al propéptido de diferentes proteínas de la coagulación como por ejemplo el Factor de Von Willebrand (vFW) y el FIXr (Rehemtulla and Kaufman 1992a, 1992b; L. C. Wasley et al. 1993; Wise et al. 1990), condición necesaria para obtener proteínas completamente maduras.

La estrategia utilizada con mayor frecuencia para el diseño de vectores que permiten la expresión de FIXr biológicamente activo en células CHO es aquella que emplea la expresión en un vector de una proteína y un marcador de selección por vez (Liu, Jonebring, Hagström, et al. 2014; L. C. Wasley et al. 1993), como por ejemplo FIX y la DHFR o PACE y adenosina deaminasa (ADA) (L. C. Wasley et al. 1993), en esta situación las moléculas de ADN se introducen secuencialmente separadas en las células huésped, de esta manera no se unen y no se cointegran en la misma posición cromosómica, en cambio cuando se obtienen células estables a partir de una única transfección las moléculas de ADN están unidas dentro del cromosoma, por lo tanto la selección para la amplificación de una de las moléculas usualmente resulta en la coamplificación de la molécula de ADN enlazada (Kaufman 1990). Esta última estrategia es la que se utilizó en el presente trabajo permitiendo la expresión de dos genes, FIX y PACE más el marcador de selección y amplificación génica, DHFR en un solo paso, esta estrategia además resulta en un proceso más rápido para obtener clones celulares estables ya que requiere solo un paso de transfección y selección de clones estables, al mismo tiempo la producción por esta vía implica un costo menor ya que se requiere un solo medio específico para la selección y un solo compuesto tóxico para la amplificación (Kaufman 1990).

El sistema de expresión CHO/DFRH⁻ permitió obtener líneas celulares estables utilizando medios de cultivo de selección específicos sin el agregado de ningún tipo antibiótico, proporcionando una ventaja adicional hacia el objetivo final que es la aprobación de un producto a ser utilizado en humanos. A su vez, facilitó el proceso de amplificación génica del FIXr en la cual se empleó la estrategia de presión selectiva, esta consistió en adicionar al medio de cultivo donde se cultivaron las células cantidades crecientes de MTX, inhibidor competitivo de la enzima DHFR, por la cual solo sobrevivieron aquellas células que incorporaron más copias del gen de la DHFR y concomitantemente del FIX.

Las líneas celulares estables obtenidas por transfección con el vector de expresión que posee el gen de la enzima PACESol produjeron 59% más de unidades de FIXr (valor promedio: 45,3 mUI.mL⁻¹) en comparación con aquellas obtenidas por transfección con el vector que posee el gen de la enzima PACE (valor promedio: 18,8 mUI.mL⁻¹), como se comentó anteriormente esta diferencia se puede deber a una mayor eficiencia del clivaje proteolítico del propéptido realizado por la variante soluble de la enzima PACE y que al mismo tiempo dicha enzima continúa con su actividad enzimática en el medio extracelular, aumentando así su capacidad de procesamiento (Rehemtulla et al. 1992; L. C. Wasley et al. 1993).

Para la etapa de amplificación génica se seleccionaron aquellas líneas celulares que expresaban más de 30 mUI.mL⁻¹ de FIXr, al finalizar esta etapa se logró incrementar la actividad biológica más de 22 veces, hasta el valor de 1UI.mL⁻¹ (1000 mU.mL⁻¹).

Durante el proceso de selección clonal (empleando cilindros de clonado o dilución límite) y amplificación génica se analizaron aproximadamente 100 clones celulares, lográndose obtener al finalizar todo el proceso 5 clones celulares estables productores de FIXr con una actividad biológica promedio de 1 UI.mL⁻¹.

Se desarrolló exitosamente un método de purificación cromatográfica de FIXr biológicamente activo a partir del cultivo de clones celulares estables creciendo en cultivos en adhesión. Para ello se utilizó una estrategia de purificación que permitió separar la fracción activa de FIXr (correctamente γ -carboxilado y glicosilado) de la fracción inactiva, con lo cual se logró incrementar la actividad específica en casi 130 veces. La recuperación de FIXr expresado en UI totales antes y después del proceso de purificación fue superior al 90 %.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis fueron fundamentales para el avance del proyecto BIOHEMO que como se comentó anteriormente tiene como objetivo final obtener un biofármaco recombinante de FIXr para el tratamiento de la hemofilia B a ser elaborado en el país, de esta manera se asegura un mayor acceso de un producto que en la actualidad solo se puede obtener por importación. A su vez este proyecto permitirá generar el desarrollo de capacidades y tecnología para la producción de otras proteínas de uso médico a nivel nacional y regional.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bradford, Marion M. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding." *Analytical Biochemistry* 72(1–2):248–54.
- Cacciatore, Jonathan J., Lawrence a. Chasin, and Edward F. Leonard. 2010. "Gene Amplification and Vector Engineering to Achieve Rapid and High-Level Therapeutic Protein Production Using the Dhfr-Based CHO Cell Selection System." *Biotechnology Advances* 28(6):673–81. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.04.003>).
- Cancio, Maria I., Ulrike M. Reiss, Amit C. Nathwani, Andrew M. Davidoff, and John T. Gray. 2013. "Developments in the Treatment of Hemophilia B: Focus on Emerging Gene Therapy." *Application of Clinical Genetics* 6:91–101.
- Chu, Lily and David K. Robinson. 2001. "Industrial Choices for Protein Production by Large-Scale Cell Culture." *Current Opinion in Biotechnology* 12(2):180–87.
- Demain, Arnold L. and Preeti Vaishnav. 2009. "Production of Recombinant Proteins by Microbes and Higher Organisms." *Biotechnology Advances* 27(3):297–306. Retrieved August 23, 2018 (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975009000202?via%3Dihub>).
- Desai, Sunil G. 2015. "Continuous and Semi-Continuous Cell Culture for Production of Blood Clotting Factors." *Journal of Biotechnology* 213:20–27. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.02.021>).
- Dolan, Gerry et al. 2017. "Haemophilia B: Where Are We Now and What Does the Future Hold?" *Blood Reviews* 32:52–60.
- Franchini, Massimo. 2014. "Current Management of Hemophilia B: Recommendations, Complications and Emerging Issues." *Expert Review of Hematology* 7(5):573–81.
- Goodeve, a. C. 2015. "Hemophilia B: Molecular Pathogenesis and Mutation Analysis." *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 13(7):1184–95.
- Hansson, K. and J. Stenflo. 2005. "Post-Translational Modifications in Proteins Involved in Blood Coagulation." *Journal of Thrombosis and Haemostasis : JTH* 3(12):2633–48.
- Hasegawa, T. 1996. "History and Evolution of Culture Maintenance and Preservation Techniques." *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*.
- Huang, Manley T. F. and Cornelia M. Gorman. 1990. "Intervening Sequences Increase Efficiency of RNA 3' Processing and Accumulation of Cytoplasmic RNA." *Nucleic Acids Research* 18(4):937–47.
- Jayapal, Kp, Kf Wlaschin, Ws Hu, and Gs Yap. 2007. "Recombinant Protein Therapeutics from CHO Cells-20 Years and Counting." *Chemical Engineering Progress* 103(10):40–47. Retrieved (<http://www.aiche.org/sites/default/files/docs/pages/CHO.pdf>).
- Jenkins, Nigel and Elisabeth M. a Curling. 1994. "Glycosylation of Recombinant Proteins: Problems and Prospects." *Enzyme and Microbial Technology* 16(5):354–64.
- Kaufman, R. J. et al. 1985. "Coamplification and Coexpression of Human Tissue-Type Plasminogen Activator and Murine Dihydrofolate Reductase Sequences in Chinese Hamster Ovary Cells." *Molecular and Cellular Biology* 5(7):1750–59.
- Kaufman, R. J. 1998. "Post-Translational Modifications Required for Coagulation Factor Secretion and Function." *Thrombosis and Haemostasis* 79(6):1068–79.

- Kaufman, R. J., L. C. Wasley, B. C. Furie, B. Furie, and C. B. Shoemaker. 1986. "Expression, Purification, and Characterization of Recombinant Gamma-Carboxylated Factor IX Synthesized in Chinese Hamster Ovary Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 261(21):9622–28. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3733688>).
- Kaufman, Randal J. 1990. "Selection and Coamplification of Heterologous Genes in Mammalian Cells." *Methods in Enzymology* 185(C):537–66.
- Kaufman, Randal J. 1998. "Post-Translational Modifications Required for Coagulation Factor Secretion and Function." *Thrombosis and Haemostasis* 79(6):1068–79.
- King, Michael W. 1996. "Blood Coagulation: Hemostasis." Retrieved July 26, 2018 (<https://themedicalbiochemistrypage.org/blood-coagulation.php#intrinsic>).
- Lee, Eryn Ujita, Jurgen Rothb, and James C. Paulson Tii. 1989. "Alteration of Terminal Glycosylation Sequences on Oligosaccharides of Chinese Hamster Ovary Cells by Expression of @ -Galactoside." *The Journal of Biological Chemistry* 264(23):13848–55.
- Lindl, T. 2002. "Zell- Und Gewebekultur." 5th Ed. *Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg*. 42–43.
- Liu, Jianming, Anna Jonebring, Jonas Hagstrom, Ann Christin Nystrom, and Ann Lovgren. 2014. "Improved Expression of Recombinant Human Factor IX by Co-Expression of GGCX, VKOR and Furin." *Protein Journal* 1–10.
- Liu, Jianming, Anna Jonebring, Jonas Hagström, Ann Christin Nyström, and Ann Lövgren. 2014. "Improved Expression of Recombinant Human Factor IX by Co-Expression of GGCX, VKOR and Furin." *Protein Journal* 33(2):174–83.
- Martin-Montañez, E., J. F. Lopez-Tellez, M. J. Acevedo, J. Pavia, and Z. U. Khan. 2010. "Efficiency of Gene Transfection Reagents in NG108-15, SH-SY5Y and CHO-K1 Cell Lines." *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 32(5):291. Retrieved (http://journals.prous.com/journals/servlet/xmlxsl/pk_journals.xml_summary_pr?p_JournalId=6&p_RefId=1498327&p_IsPs=N).
- Puck, T. T. 1958. "Genetics of Somatic Mammalian Cells: Iii. Long-Term Cultivation of Euploid Cells From Human and Animal Subjects." *Journal of Experimental Medicine* 108(6):945–56. Retrieved (<http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.108.6.945>).
- Rehemtulla, A. and R. J. Kaufman. 1992a. "Preferred Sequence Requirements for Cleavage of pro-von Willebrand Factor by Propeptide-Processing Enzymes." *Blood* 79(9):2349–55.
- Rehemtulla, A. and R. J. Kaufman. 1992b. "Protein Processing within the Secretory Pathway." *Current Opinion in Biotechnology* 3(5):560–65.
- Rehemtulla, a, a J. Dorner, and R. J. Kaufman. 1992. "Regulation of PACE Propeptide-Processing Activity: Requirement for a Post-Endoplasmic Reticulum Compartment and Autoproteolytic Activation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89(17):8235–39.
- Ribeiro, Daniel A., Douglas F. Passos, Helen C. Ferraz, and Leda R. Castilho. 2013. "Anion-Exchange Purification of Recombinant Factor IX from Cell Culture Supernatant Using Different Chromatography Supports." *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 938:111–18. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.09.002>).
- Richards, Eric J. and Sarah C. R. Elgin. 2002. "Epigenetic Codes for Heterochromatin Formation and Silencing: Rounding up the Usual Suspects." *Cell* 108(4):489–500.

- Roth, David a. et al. 2001. "Human Recombinant Factor IX: Safety and Efficacy Studies in Hemophilia B Patients Previously Treated with Plasma-Derived Factor IX Concentrates." *Blood* 98(13):3600–3606.
- Schaub, Robert G. 2011. "Recent Advances in the Development of Coagulation Factors and Procoagulants for the Treatment of Hemophilia." *Biochemical Pharmacology* 82(2):91–98. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2011.03.015>).
- Srivastava, a. et al. 2013. "Guidelines for the Management of Hemophilia." *Haemophilia* 19(1).
- Stonebraker, Jeffrey S. et al. 2011. "H Echos Y C lfras Informes de Prevalencia de La Hemofilia Alrededor Del Mundo College of Management." *Haemophilia* 16(8):20–32.
- Urlaub, G. and L. A. Chasin. 1980. "Isolation of Chinese Hamster Cell Mutants Deficient in Dihydrofolate Reductase Activity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77(7):4216–20.
- Wasley, L. C., A. Rehemtulla, J. A. Bristol, and R. J. Kaufman. 1993. "PACE/furin Can Process the Vitamin K-Dependent pro-Factor IX Precursor within the Secretory Pathway." *Journal of Biological Chemistry* 268(12):8458–65.
- Wasley, Louise C., Alnawaz Rehemtulla, J. Andrew Bristol, and Randal J. Kaufman. 1993. "PACE/furin Can Process the Vitamin K-Dependent pro-Factor IX Precursor within the Secretory Pathway." *Journal of Biological Chemistry* 268(12):8458–65.
- White, Gilbert C., Edward M. Pickens, Darla K. Liles, and Harold R. Roberts. 1998. "Mammalian Recombinant Coagulation Proteins: Structure and Function." *Transfusion Science* 19(2):177–89.
- Whitlock, C. a and C. E. Muller-Sieburg. 1990. "Long-Term B Lymphoid Cultures from Murine Bone Marrow : Establishment and Cloning by Using Stromal Cell Line AC 6.21." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 5:303–22. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9276273>5Cn<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21374134>).
- Wiebe, et al., et al. 1989. "A Multifaceted Approach to Assure That Recombinant T-PA Is Free of Adventitious Virus." *Advances in Animal Cell Biology and Technology for Bioprocess.*
- Wise, R. J. et al. 1990. "Expression of a Human Proprotein Processing Enzyme: Correct Cleavage of the von Willebrand Factor Precursor at a Paired Basic Amino Acid Site." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(23):9378–82.
- World Federation of Hemophilia. 2017. "Report of the Annual Global Survey 2016." *World Federeation of Hemophilia* (October):3–73. Retrieved (<http://www1.wfh.org/publications/files/pdf-1690.pdf>).
- Wurm, Florian M. 2004. "Production of Recombinant Protein Therapeutics in Cultivated Mammalian Cells." *Nature Biotechnology* 22(11):1393–98.
- Zhu, Jianwei. 2012. "Mammalian Cell Protein Expression for Biopharmaceutical Production." *Biotechnology Advances* 30(5):1158–70. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.022>).