

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



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

“Biotecnología aplicada al desarrollo de una nueva hormona folículo-estimulante bovina recombinante de larga duración”

Lic. Carlos Javier Villarraza

Directora de Tesis: Dra. Natalia Ceaglio
Co-director de Tesis: Dr. Claudio Prieto

Laboratorio de Desarrollo Biotecnológico
Centro Biotecnológico del Litoral
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas
Universidad Nacional del Litoral

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que directa o indirectamente han contribuido a la realización de este trabajo de tesis y que me han acompañado en este largo camino.

A la Universidad Nacional del Litoral y la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, por contribuir a mi formación profesional y brindarme el conocimiento necesario para realizar este trabajo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por el apoyo económico otorgado durante mi trayectoria doctoral, el cual fue indispensable para llevar adelante esta etapa de formación.

Al Centro Biotecnológico del Litoral (CBL), por ofrecerme el respaldo y los recursos fundamentales para concretar este proyecto. A sus directivos y a todo su equipo humano, por sostener su desarrollo y por ser el espacio que me permitió crecer y evolucionar, tanto profesional como personalmente.

A Natalia y a Claudio, gracias por la confianza que depositaron en mí. Por haberme guiado (con mucha paciencia) a lo largo de este trabajo y por transmitirme todos sus conocimientos.

A todos mis compañeros del laboratorio, por su generosidad al ofrecer ayuda siempre que lo necesité, por compartir su experiencia y saberes, y por las risas y charlas que hicieron que cada jornada fuera más llevadera. Gracias por la amistad construida a lo largo del tiempo y por convertir el espacio de trabajo en un lugar cálido, casi como un segundo hogar. Un agradecimiento especial para mi “tesis bro” Fran, por el respaldo incondicional y por el acompañamiento durante la escritura de este trabajo.

A todo el personal de Zelltek y Biotecnofe por la predisposición y toda la asistencia que me han brindado a lo largo de estos años.

A Joaquín, mi compañero de vida, por estar presente en cada etapa de este recorrido. Gracias por tu paciencia infinita, por tu apoyo constante incluso en los momentos más difíciles, y por creer en mí cuando yo mismo dudaba. Gracias por celebrar cada pequeño logro como si fuera propio, por escucharme cuando necesitaba desahogarme, y por brindarme siempre una palabra de aliento.

A mi familia, por el inmenso sacrificio que han hecho para que yo pudiera llegar hasta este momento. Gracias por su apoyo incondicional y por acompañarme en cada etapa de este camino.

APORTES CIENTÍFICOS Y TECNOLÓGICOS

Parte de los resultados de este trabajo de tesis fueron publicados en:

Villarraza J., Antuña S., Tardivo B.; Rodríguez M. C., Días P.; Notaro U., Ortega H., Ceaglio N., Prieto C. **Development of a biotechnology process for production of a novel hyperglycosylated long-acting recombinant bovine follicle-stimulating hormone.** *Biotechnology Journal* 2024. <https://doi.org/10.1002/biot.202400260>.

ÍNDICE

ÍNDICE	3
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	9
CÓDIGO DE UNA Y TRES LETRAS PARA AMINOÁCIDOS	15
UNIDADES	16
RESUMEN.....	17
ABSTRACT	19
INTRODUCCIÓN.....	22
1. Biofármacos	22
2. Sistemas de expresión de proteínas recombinantes	22
2.1. Bacterias	23
2.2. Levaduras y hongos filamentosos	23
2.3. Células de insecto	24
2.4. Protozoos	24
2.5. Células de mamífero	25
2.6. Animales transgénicos	25
2.7. Plantas transgénicas	26
3. Tecnología de cultivo de células de mamífero	26
3.1. Tipos de cultivos celulares	26
3.2. Cultivo de células de mamífero en biorreactor	27
3.3. Líneas celulares de mamífero utilizadas para la producción de proteínas recombinantes para uso terapéutico.....	28
4. Transferencia de material genético	29
4.1. Transfección.....	30
4.2. Transducción.....	31
5. Glicosilación de proteínas	33
5.1. N-glicosilación	34
5.2. O-Glicosilación	38
5.3. Factores que afectan la glicosilación de las proteínas terapéuticas	39
5.3.1. Tipo celular y factores específicos de especie	40
5.3.2. Factores ambientales y condiciones de cultivo	41
5.3.3. Medio de cultivo y nutrientes	41
5.3.4. Condiciones de cultivo	41
5.3.5. Plataformas tecnológicas	42
5.4. Impacto de la glicosilación sobre las propiedades de las proteínas	42
5.4.1. Efectos sobre la estabilidad de las proteínas	42
5.4.2. Efectos sobre la farmacocinética y <i>clearance in vivo</i>	43
5.4.3. Efectos sobre la actividad biológica <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	44
5.4.4. Efectos sobre la antigenicidad e inmunogenicidad.....	44
6. Glicoingeniería	44

6.1.	Glicoingeniería celular	45
6.1.1.	Ingeniería de células de mamíferos.....	45
6.1.2.	Ingeniería de células no mamíferas.....	46
6.2.	Glicoingeniería de proteínas	47
6.2.1.	N-glicoingeniería de proteínas	47
6.2.2.	O-glicoingeniería de proteínas	49
7.	Ganadería y terapias hormonales	50
8.	Familia de hormonas glicoproteicas	51
9.	Hormona folículo-estimulante	52
9.1.	Glicosilación	53
9.2.	Interacción con el receptor.....	54
9.3.	bFSH en protocolos de superovulación	56
9.4.	Producción de bFSH recombinante	57
	OBJETIVOS	61
1.	Objetivo general	61
2.	Objetivos específicos	61
	MATERIALES Y MÉTODOS	62
1.	Reactivos y soluciones	63
2.	Diseño de las variantes recombinantes de bFSH.....	63
3.	Vectores plasmídicos	63
3.1.	Vectores pUC57 rbFSH α y rbFSH β -LD	63
3.2.	Vector pLV-EF1 α	64
3.3.	Vector pLV-EF1 α -rbFSH α , pLV-EF1 α -rbFSH β y pLV-EF1 α -rbFSH β -LD	64
3.4.	Vectores lentivirales empaquetadores.....	65
4.	Técnicas de biología molecular	66
4.1.	Líneas celulares procariotas	66
4.2.	Medios de cultivo para células procariotas	66
4.3.	Purificación de ADN plasmídico.....	67
4.3.1.	Minipreparación de ADN plasmídico	67
4.3.2.	Maxipreparación de ADN plasmídico	67
4.4.	Determinación de la concentración y pureza del ADN	68
4.5.	Digestiones enzimáticas	69
4.6.	Electroforesis de ADN en geles de agarosa	69
4.7.	Precipitación de ADN	70
4.8.	Purificación de ADN a partir de geles de agarosa	70
4.9.	Reacción de ligación de ADN	70
4.10.	Preparación de células <i>E. coli</i> TOP 10 competentes por el método químico	71
4.11.	Transformación de células competentes	72
4.12.	Chequeo de las transformaciones mediante PCR en colonia	72
4.13.	Criopreservación de cepas bacterianas	73

4.14.	Revitalización de cepas bacterianas	73
5.	Técnicas de cultivo celular	74
5.1.	Líneas celulares	74
5.2.	Medios de cultivo y suplementos para células animales	74
5.3.	Sistemas de cultivo celular	76
5.3.1.	Cultivos en adherencia	76
5.3.2.	Cultivos en suspensión en pequeña escala	76
5.3.3.	Cultivo en biorreactor tanque agitado de 1 L	76
5.4.	Determinaciones analíticas en cultivos celulares	77
5.4.1.	Determinación de la concentración y viabilidad de células	77
5.4.2.	Monitoreo del consumo de glucosa y de la producción de lactato en sobrenadantes de cultivo	77
5.4.3.	Estimación de parámetros cinéticos de cultivo. Determinación de la integral de células viables (ICV), velocidad específica de crecimiento celular y velocidad específica de consumo y producción de metabolitos	78
5.5.	Criopreservación de líneas celulares de mamífero	79
5.6.	Revitalización de líneas celulares de mamífero	79
5.7.	Desarrollo de líneas celulares recombinantes	79
5.7.1.	Ensamblado de partículas lentivirales (PLs)	79
5.7.2.	Transducción de células de mamífero con LPs	80
5.7.3.	Selección de células recombinantes	81
5.8.	Obtención de clones celulares	81
5.9.	Adaptación de células a crecimiento en suspensión en medio de cultivo libre de SFB	82
5.10.	Determinación de la productividad celular específica	83
6.	Purificación de variantes rbFSH	84
6.1.	Cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados (IMAC)	84
6.2.	Evaluación del proceso de purificación	85
6.3.	Concentración y diafiltración	85
7.	Desarrollo de un método para la cuantificación de variantes de rbFSH mediante ELISA sándwich (sELISA)	86
7.1.	Obtención de anticuerpos policlonales anti-rbFSH	86
7.1.1.	Plan de inmunización	86
7.1.2.	Evaluación del título de anticuerpos anti-rbFSH	86
7.2.	Producción de anticuerpos monoclonales anti-hFSH β	87
7.2.1.	Cultivo de hibridoma y producción de anticuerpos monoclonales (mAb) anti-hFSH β	87
7.2.2.	Purificación del mAb P3A8 mediante cromatografía de afinidad a proteína A	87
7.2.3.	Evaluación del proceso de purificación	88
7.3.	Optimización de un sELISA para la cuantificación de variantes de rbFSH mediante diseño experimental (DoE)	88
8.	Caracterización analítica de las variantes de rbFSH	91

8.1.	Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	91
8.1.1.	Detección mediante tinción con azul brillante de Coomassie	92
8.1.2.	Detección mediante tinción con iones plata	92
8.1.3.	Detección inmunoquímica (<i>western blot</i>).....	93
8.2.	Métodos espectroscópicos	94
8.2.1.	Espectrofotometría.....	94
8.2.2.	Espectroscopía de emisión de fluorescencia	94
8.2.3.	Dicroísmo circular	95
8.3.	Métodos para la caracterización de glúcidos.....	95
8.3.1.	Isoelectroenfoque (IEF)	95
8.3.2.	N- y O-deglicosilación enzimática.....	95
8.3.3.	Determinación del contenido de ácido siálico (Neu5Ac)	96
8.4.	Desarrollo de una técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	97
8.4.1.	Cromatografía en fase reversa (RP-HPLC).....	97
8.4.2.	Cromatografía de exclusión molecular (SEC-HPLC)	97
9.	Caracterización biológica de las variantes de rbFSH	98
9.1.	Evaluación de los parámetros farmacocinéticos de las variantes de rbFSH en animales de experimentación utilizando la vía subcutánea	98
9.1.1.	Modelo de un compartimento con cinética de absorción y eliminación de primer orden	98
9.1.2.	Modelo de un compartimento con compartimentos de tránsito y cinética de absorción y eliminación de primer orden	102
9.1.3.	Estimación de los parámetros poblacionales, individuales y evaluación de la calidad de los modelos	104
9.2.	Valoración de la actividad biológica de las variantes de rbFSH en animales de experimentación	105
9.3.	Evaluación de la actividad biológica de las variantes de rbFSH en ganado bovino .	105
10.	Análisis de datos	106
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	109
1.	Desarrollo de metodologías analíticas para la caracterización y cuantificación de variantes de rbFSH	109
1.1.	Obtención de anticuerpos policlonales anti-rbFSH.....	109
1.2.	Producción de anticuerpos monoclonales anti-hFSH β	110
1.3.	Desarrollo de un sELISA para la cuantificación de variantes de rbFSH	112
1.3.1.	Optimización de un sELISA para la cuantificación de variantes de rbFSH mediante diseño experimental (DoE).....	112
1.3.2.	Validación de las condiciones óptimas del sELISA para la cuantificación de ambas variantes de rbFSH	115
1.3.2.1.	Cifras de mérito.....	115
1.3.2.2.	Precisión	116
1.3.2.3.	Exactitud y efecto matriz	117

1.4.	Optimización de un ensayo de IEF para la determinación del perfil de glicoformas de las variantes de rbFSH	119
1.5.	Optimización de un método de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para el análisis de las variantes de rbFSH	120
1.5.1.	Cromatografía en fase reversa (RP-HPLC)	121
1.5.2.	Cromatografía de exclusión molecular (SEC-HPLC)	122
2.	Desarrollo de líneas celulares recombinantes productoras de las variantes de rbFSH. Cultivo en alta densidad	127
2.1.	Construcción de vectores de expresión para células eucariotas	127
2.1.1.	Construcción de los vectores de transferencia pLV-EF1 α -rbFSH α , pLV-EF1 α -rbFSH β y pLV-EF1 α -rbFSH β -LD	127
2.1.2.	Ensamblado de partículas lentivirales (PLs)	130
2.2.	Obtención de líneas celulares productoras de rbFSH y rbFSH-LD	131
2.3.	Cultivo continuo en alta densidad	132
3.	Desarrollo de un proceso de purificación de las variantes de rbFSH. Caracterización de las moléculas purificadas	134
3.1.	Desarrollo de una metodología de purificación de las variantes de rbFSH a partir de sobrenadante de cultivo	134
3.1.1.	Optimización de una cromatografía IMAC para la purificación de la variante rbFSH	135
3.1.2.	Optimización de una cromatografía IMAC para la purificación de la variante rbFSH-LD	139
3.2.	Caracterización fisicoquímica de las variantes de rbFSH purificadas	142
3.2.1.	Caracterización mediante SDS-PAGE	142
3.2.2.	Caracterización del perfil de glicosilación	144
3.2.2.1.	Deglicosilación enzimática	144
3.2.2.2.	Isoelectroenfoque	146
3.3.	Caracterización biológica de las variantes de rbFSH purificadas	146
3.3.1.	Evaluación de las propiedades farmacocinéticas en animales de experimentación.	146
3.3.2.	Determinación de la potencia biológica <i>in vivo</i>	150
4.	Desarrollo de clones celulares productores de rbFSH-LD. Cultivo en alta densidad y purificación	151
4.1.	Selección de células recombinantes mediante el empleo de puromicina	151
4.2.	Obtención de clones celulares productores de rbFSH-LD	151
4.2.1.	Clonado de las líneas celulares	151
4.2.2.	Adaptación de clones al crecimiento en suspensión	154
4.2.3.	Análisis de las características de crecimiento, consumo de nutrientes y producción de metabolitos por parte de los clones seleccionados	154
4.3.	Producción de rbFSH-LD mediante el cultivo del clon P8D3 en suspensión en biorreactores en medio libre de suero fetal bovino	156

4.4.	Optimización del proceso de purificación cromatográfico de la rbFSH-LD producida por el clon P8D3	157
4.4.1.	Evaluación de la capacidad dinámica de la resina IMAC	157
4.4.2.	Purificación de la rbFSH-LD producida por el clon P8D3.....	159
5.	Caracterización comparativa de los lotes de las diferentes variantes de rbFSH	163
5.1.	Caracterización fisicoquímica	164
5.1.1.	SDS-PAGE.....	164
5.1.2.	Isoelectroenfoque	165
5.1.3.	Análisis del contenido de ácido siálico mediante HPAEC-PAD	166
5.1.4.	Espectroscopía de emisión de fluorescencia	166
5.1.5.	Espectroscopía de dicroísmo circular (CD)	168
5.1.6.	SEC-HPLC	170
5.2.	Caracterización biológica	172
5.2.1.	Determinación de la potencia biológica <i>in vivo</i>	172
5.2.2.	Prueba de concepto en animales de destino.....	172
	CONCLUSIONES.....	175
	BIBLIOGRAFÍA.....	179

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
4-AAP	4-aminoantipirina
ABE	Actividad biológica específica
ACN	Acetonitrilo
ADCC	Actividad citotóxica mediada por anticuerpos (<i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i>)
ADP	Adenosín difosfato
AFC	Folículos antrales (<i>Antral follicles</i>)
AIC	Criterio de información de Akaike (<i>Akaike information criterion</i>)
AMP	Adenosín monofosfato
AMPc	AMP cíclico
AmpR	Gen de resistencias ampicilina
ANOVA	Análisis de la varianza (<i>Analysis of variance</i>)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNt	ARN de transferencia
ARTs	Tecnología de reproducción asistida (<i>Assisted reproductive technology</i>)
ASB	Albúmina sérica bovina
ASGPR	Receptor de asialoglicoproteínas (<i>Asialoglycoprotein receptor</i>)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosín trifosfato
AUC	Área debajo de la curva (<i>Area under the curve</i>)
BBD	Diseño de tipo Box Behnken
bFSH	Hormona folículo-estimulante bovina
BHK	<i>Baby Hamster Kidney cells</i>
BIC	Criterio de información bayesiano (<i>Bayesian information criterion</i>)
BICc	Criterio de información bayesiano corregido (<i>Corrected bayesian information criterion</i>)
CBB	Azul brillante de Coomassie (<i>Coomassie brilliant blue</i>)
C _f	Concentración final
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary cell</i>
C _i	Concentración inicial
Cl	<i>Clearance</i>
CL	Cuerpo luteo
C _{máx}	Concentración plasmática máxima de la droga luego de la administración
CMV	Citomegalovirus
Col E1 ori	Origen de replicación bacteriano
C _p	Concentración de droga en plasma
cPPT	<i>Central polypurine tract</i>
CREB	Proteína de unión a elementos de respuesta a AMP cíclico (<i>cAMP response element-binding protein</i>)

csp	Cantidad suficiente para
CTP	Péptido C-terminal (<i>Carboxyl-terminal peptide</i>)
CV	Coeficiente de variación
DAD	Detector de arreglo de diodos
D _B	Cantidad de fármaco en el cuerpo
DCV	Densidad de células viables
D _E	Cantidad de fármaco eliminado
D _{GI}	Cantidad de fármaco en el tracto gastrointestinal
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxinucleótidos
DO	Densidad óptica
Dol-P	Dolicol fosfato
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECD	Ectodominio
eCG	Gonadotrofina coriónica equina
EF1 α	Factor de elongación 1 α (<i>Elongation factor 1α</i>)
ELISA	Enzimoinmunoensayo (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
ENGase	Endo- β -N-acetilglucosaminidasa
EPO	Eritropoyetina
EV	Embriones viables
F	Fracción de fármaco absorbida
FAN	Folículos anovulatorios
F _c	Fragmento cristizable
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIM	Matriz de información de Fisher (<i>Fisher information matrix</i>)
FSH	Hormona folículo-estimulante
FSHR	Receptor de la hormona FSH (<i>FSH receptor</i>)
Fw	En sentido directo (<i>Forward</i>)
gag	Proteína de la cápside lentiviral
Gal	Galactosa
GalNAc	N-acetilgalactosamina
GALNT	N-acetilgalactosaminiltransferasa
GC	Células de la granulosa (<i>Granulosa cells</i>)
GDP	Guanosín difosfato
GH	Hormona de crecimiento
GI	Tracto gastrointestinal
Glc	Glucosa
GlcNAc	N-acetilglucosamina
GlcNAc-TI-V	N-acetilglucosaminiltransferasa I-V

GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GMOP	<i>GM-CSF O-glycosylated Peptide</i>
GOD	Glucosa oxidasa
GPCR	<i>G protein-coupled receptors</i>
GpHR	Receptor de hormonas glicoproteicas (<i>Glycoprotein hormone receptors</i>)
GTP	Guanosín trifosfato
hCG	Gonadotrofina coriónica humana
HEK	<i>Human Embryonic Kidney cells</i>
hEPO	Eritropoyetina humana
hFSH	Hormona folículo-estimulante humana
hIFN- α	Interferón alfa humano
hIFN- β	Interferón beta humano
HMWA	Agregados de alta masa molecular
HMWS	Especies de alta masa molecular
HPAE-PAD	Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detección amperométrica pulsada (<i>High-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection</i>)
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (<i>High-performance liquid chromatography</i>)
HRP	Peroxidasa de rábano picante (<i>Horseradish peroxidase</i>)
IA	Inseminación Artificial
IATF	Inseminación Artificial a tiempo fijo
ICH	<i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>
ICV	Integral en el tiempo de células viables
IEF	Isoelectroenfoque
IFN- α	Interferón alfa
IFN- β	Interferón beta
Igs	Inmunoglobulinas
IMAC	Cromatografía de pseudoafinidad a iones metálicos inmovilizados (<i>Immobilized Metal Chelate Affinity Chromatography</i>)
k	Constante de eliminación de primer orden
ka	Constante de velocidad de absorción de primer orden
k _{tr}	Constante de velocidad de transferencia
<i>L. tarentolae</i>	<i>Leishmania tarentolae</i>
LacNAc	N-acetil-lactosamina
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LH	Hormona luteinizante
LOD	Límite de detección (<i>Limit of detection</i>)
LOQ	Límite de cuantificación (<i>Limit of quantitation</i>)
LRR	Repeticiones ricas en leucinas (<i>Leucine-rich repeat</i>)
LTRs	Repeticiones terminales largas (<i>Long terminal repeats</i>)

LVs	Vectores lentivirales (<i>Lentiviral vectors</i>)
mAb	Anticuerpo monoclonal (<i>Monoclonal antibody</i>)
Man	Manosa
MCMC	Procedimiento de Montecarlo basado en cadenas de Markov (<i>Markov chain Monte Carlo</i>)
MDCK	<i>Madin-Darby Canine Kidney cells</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
mGMOP	<i>Modified GMOP</i>
MOET	Transferencia de embriones por ovulación múltiple (<i>Multiple ovulation embryo transfer</i>)
Mtt	Tiempo medio de tránsito (<i>Mean transit time</i>)
MW	Masa molecular (<i>Molecular weight</i>)
Neu5Ac	Ácido N-acetilneuramínico
Neu5Gc	Ácido N-glicolilneuramínico
NIBSC	<i>National Institute for Biological Standards and Control</i>
NLME	Modelos de efectos mixtos no lineales (<i>Nonlinear mixed-effects model</i>)
OF	Ovocitos fecundados
ON	Durante la noche (<i>Overnight</i>)
ONF	Ovocitos no fecundados
OPD	Diclorhidrato de O-fenilendiamina
OST	Oligosacariltransferasa
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
pAb	Anticuerpo policlonal (<i>Polyclonal antibody</i>)
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
PBS	<i>Buffer</i> fosfato salino
PBS-T	PBS con Tween 20
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polietilenglicol
PEI	Polietilenimina
pFSH	Hormona folículo-estimulante porcina
pl	Punto isoeléctrico
pit-FSH	Hormona folículo-estimulante pituitaria
PK	Farmacocinética
PKA	Proteína cinasa A (<i>Protein kinase A</i>)
PLs	Partículas lentivirales
pLV	Plásmido lentiviral
PM	CD BHK-21 <i>Production Medium</i>
PNI	<i>Buffer</i> fosfato con cloruro de sodio e imidazol
pO ₂	Presión de oxígeno disuelto
POD	Peroxidasa
pol	Retrotranscriptasa lentiviral

PTM	Modificaciones postraduccionales (<i>Post-translational modification</i>)
PVDF	Difluoruro de polivinilo (<i>polyvinylidene difluoride</i>)
q _p	Velocidad específica de consumo/producción
rbFSH	Hormona folículo-estimulante recombinante bovina
rbFSH-LD	Hormona folículo-estimulante recombinante bovina de larga duración
RCLs	Lentivirus competente para la replicación (<i>Replication competent lentivirus</i>)
RE	Retículo endoplasmático
reCG	Gonadotrofina coriónica equina recombinante
Rev	Proteína lentiviral Rev
rFSH	Hormona folículo-estimulante recombinante
rhFSH	Hormona folículo-estimulante recombinante humana
RP	Fase reversa (<i>Reverse phase</i>)
RRE	Elemento de respuesta a rev (<i>Rev response element</i>)
RSM	Metodología de superficie de respuesta (<i>Response surface methodology</i>)
Rv	En sentido reverso (<i>Reverse</i>)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
s.c.	Subcutánea
S ₀	Desvío estándar de la concentración predicha para una muestra blanco
SAEM	<i>Stochastic Approximation Expectation Maximization</i>
SASA	Área superficial accesible al solvente (<i>Solvent-accessible surface area</i>)
SD	Desviación estándar
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SEC	Cromatografía de exclusión molecular (<i>Size exclusion chromatography</i>)
sELISA	ELISA tipo sándwich
SEM	Error estándar de la media (<i>Standard error of the mean</i>)
SEN	Sensibilidad
SFB	Suero fetal bovino
Sfit	Desvío estándar de los residuos de la regresión lineal
SFM	Medio libre de suero fetal bovino (<i>Serum free medium</i>)
Sia	Ácido siálico
SIN	Auto inactivante (<i>Self-inactivating</i>)
SN	Sobrenadante
SOV	Super ovulación
SV40	Virus de simio 40
t _{1/2,elim}	Tiempo de vida media de eliminación de la droga
TA	Temperatura ambiente
TAE	Tris-acetato-EDTA
tat	Proteína lentiviral tat
TBS	Solución salina tamponada con Tris
TBS-T	TBS con Tween 20
Td	Transducción

TFF	Filtración por flujo tangencial (<i>Tangential flow filtration</i>)
TG	Transgén
t_{lag}	Tiempo de retardo
$t_{m\acute{a}x}$	Tiempo para alcanzar la $C_{m\acute{a}x}$
TOOS	<i>N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3-methylaniline</i>
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminoetano
TSH	Hormona estimuladora de tiroides
UDP	Uridina difosfato
UV	Ultravioleta
V+I	Vector + inserto
var	Varianza
VC	Volumen de columna
V_D	Volumen aparente de distribución
VR	Vector religado
VSV	Virus de la estomatitis vesicular
WPRE	<i>Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element</i>
wt	Tipo salvaje (<i>Wild type</i>)
β -ME	β -mercaptoetanol
λ	Longitud de onda

CÓDIGO DE UNA Y TRES LETRAS PARA AMINOÁCIDOS

Alanina	A	Ala
Arginina	R	Arg
Aspargina	N	Asn
Aspártico	D	Asp
Cisteína	C	Cys
Fenilalanina	F	Phe
Glicina	G	Gly
Glutámico	E	Glu
Glutamina	Q	Gln
Histidina	H	His
Isoleucina	I	Ile
Leucina	L	Leu
Lisina	K	Lys
Metionina	M	Met
Prolina	P	Pro
Serina	S	Ser
Tirosina	Y	Tyr
Treonina	T	Thr
Triptófano	W	Trp
Valina	V	Val

UNIDADES

Å	Ångström (1×10^{-10} m)
% (V/V)	Mililitros de solvente en 100 ml de solución
% (P/V)	Gramos de soluto en 100 ml de solución
A	Amperio
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro cuadrado
g	Gramo
h	Hora
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramo
L	Litro
M	Molar
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
N	Normal
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
nmol	Nanomol
°C	Grado Celsius
pmol	Picomol
ppb	Partes por billón ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
<i>rpm</i>	Revoluciones por minuto
seg	Segundo
U	Unidades
UI	Unidades internacionales
V	Voltio
vol.	Volúmenes
W	Vatio
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
μM	Micromolar
Ω	Ohm

RESUMEN

La ganadería es una actividad económica clave en Argentina y en la región, con una alta rentabilidad ligada directamente a la eficiencia reproductiva y calidad genética del ganado. En este contexto, la técnica de superovulación y transferencia de embriones (MOET) ha sido ampliamente utilizada para acelerar la mejora genética, permitiendo que un número reducido de hembras de alto valor genético genere numerosos descendientes en poco tiempo. Esta técnica depende del uso de la hormona folículo-estimulante (FSH), que usualmente se obtiene de glándulas pituitarias de origen animal. Sin embargo, estas preparaciones presentan importantes desventajas: variabilidad entre lotes, posibles contaminaciones con LH y una vida media muy corta en circulación. Por ello, el desarrollo de una FSH recombinante bovina (rbFSH) con mejores propiedades farmacocinéticas representa una solución prometedora.

En esta tesis se diseñó una variante de larga duración de la FSH bovina recombinante (rbFSH-LD), incorporando 18 sitios potenciales de O-glicosilación mediante la adición de tres repeticiones del péptido mGMOP en el extremo C de la subunidad β . Además, se produjo la rbFSH nativa, es decir, sin modificar. Todas las subunidades (α , β y β -LD), fueron producidas fusionadas a etiquetas de histidina (His6) para facilitar su purificación. Se generaron líneas celulares estables para ambas variantes mediante transducción lentiviral, que luego se adaptaron al cultivo en suspensión en medio libre de suero fetal bovino (SFM) y se cultivaron en biorreactores de 1 L operados en modo de perfusión.

Para purificar las hormonas recombinantes, se optimizó un protocolo basado en cromatografía de pseudoafinidad a iones metálicos inmovilizados (IMAC), utilizando resinas con níquel para la captura e imidazol como agente de elución. Este método permitió obtener hormonas con pureza superior al 99% y un rendimiento global de aproximadamente 70%. Las proteínas purificadas fueron concentradas y diafiltradas para su posterior caracterización.

Los análisis por SDS-PAGE y *western blot* confirmaron la identidad y el perfil electroforético de las proteínas. La variante rbFSH-LD mostró una mayor masa molecular y diversidad isoformas en comparación con la hormona sin modificar, incluyendo un subgrupo de isoformas más ácidas, atribuible a su elevado contenido de ácido siálico. Los ensayos farmacocinéticos revelaron que la rbFSH-LD posee una vida media más prolongada y menor tasa de eliminación plasmática. Además, la variante hiperglicosilada exhibió una actividad biológica específica 2,4 veces mayor que la rbFSH en un modelo en ratas.

El clonado de la línea celular productora de rbFSH-LD permitió seleccionar el clon P8D3 por su elevada productividad y velocidad de crecimiento. Este clon fue cultivado a escala de biorreactor, logrando purificar la hormona con alta eficiencia (65% de rendimiento, >99% de pureza). El análisis fisicoquímico evidenció una alta proporción del dímero activo (70–87%) y bajo contenido de agregados (alrededor del 1%).

Estudios estructurales mediante dicroísmo circular mostraron conformaciones similares entre las variantes, predominando láminas beta y estructuras desordenadas. Los ensayos de actividad biológica en ratas confirmaron la elevada actividad específica de la rbFSH-LD hiperglicosilada ($\sim 10000 \text{ UI} \cdot \text{mg}^{-1}$), manteniendo un valor aproximadamente 2,4 veces superior al de la variante nativa, en concordancia con lo observado previamente para la línea celular productora. En una prueba de concepto en vacas, una única dosis de 180 μg de rbFSH-LD generó una respuesta de superovulación similar a la obtenida con 8 dosis de rbFSH convencional, lo que sugiere la posibilidad de simplificar los tratamientos y reducir costos.

Adicionalmente, se desarrollaron herramientas analíticas complementarias, incluyendo la obtención de anticuerpos policlonales, un ELISA tipo sándwich para cuantificación, una metodología optimizada de IEF para análisis de perfil glicosídico y un protocolo de SEC-HPLC para la detección de agregados.

En resumen, la estrategia descrita en este trabajo permitió desarrollar los primeros pasos de un sistema de producción de una nueva variante hiperglicosilada de bFSH recombinante con una mayor actividad biológica *in vivo*, mejores parámetros farmacocinéticos y ausencia de actividad de LH, lo que representa una alternativa atractiva al uso de preparados comerciales de FSH porcina derivada de glándulas pituitarias.

ABSTRACT

Livestock production is a key economic activity in Argentina and across the region, with profitability closely linked to the reproductive efficiency and genetic quality. In this context, the multiple ovulation and embryo transfer (MOET) technique has been widely used to accelerate genetic improvement, enabling a small number of high-value donor females to produce numerous offspring within a short period. This methodology relies on the use of follicle-stimulating hormone (FSH), traditionally obtained from animal pituitary glands. However, these preparations present significant drawbacks, including batch-to-batch variability, potential contamination with luteinizing hormone (LH), and a very short circulatory half-life. Therefore, the development of a recombinant bovine FSH (rbFSH) with improved pharmacokinetic properties represents a promising alternative.

This thesis describes the design of a long-acting recombinant bovine FSH variant (rbFSH-LD), in which 18 potential O-glycosylation sites were introduced by fusing three tandem copies of the mGMOP peptide to the C-terminus of the β -subunit. Unmodified wild-type rbFSH was also produced. All subunits (α , β and β -LD) were fused to C-terminal His6-tags to facilitate purification. Stable cell lines expressing both rbFSH variants were generated by lentiviral transduction, adapted to serum-free suspension culture (SFM), and scaled up in 1-L perfusion-mode bioreactors.

To purify the recombinant hormones, an optimized protocol based on immobilized metal affinity chromatography (IMAC) was developed, using nickel-charged resins and imidazole for elution. This method yielded highly pure hormones (>99%) with an overall recovery of approximately 70%. The purified proteins were then concentrated and diafiltered for further characterization.

SDS-PAGE and western blot analyses confirmed the identity and electrophoretic profile of the proteins. The rbFSH-LD variant exhibited a higher apparent molecular mass and a greater diversity of acidic isoforms compared to wild-type rbFSH, consistent with its increased sialic acid content. Pharmacokinetic studies revealed an extended half-life and reduced plasma clearance of rbFSH-LD. Moreover, this hyperglycosylated variant exhibited a 2.4-fold higher specific biological activity compared to rbFSH in a rat model.

To ensure consistent production, the rbFSH-LD-producing cell line was cloned and clone P8D3 was selected due to its high productivity and growth rate. Upon bioreactor scale-up, rbFSH-LD was efficiently purified from the culture supernatant with high yield (65%) and purity (>99%). Physicochemical analysis revealed a high proportion of the active dimeric form (70–87%) and minimal levels of high molecular weight aggregates (approximately 1%).

Circular dichroism studies showed that the hormone variants shared similar secondary structures, mainly β -sheets and disordered regions. Bioassays in rats confirmed the high specific biological activity ($\sim 10000 \text{ IU.mg}^{-1}$) of hyperglycosylated rbFSH-LD, maintaining a value approximately 2.4-fold higher than that of the native variant, in agreement with the results previously observed for the parental cell line. In a proof-of-concept trial in cows, a single dose of $180 \mu\text{g}$ rbFSH-LD induced a superovulatory response equivalent to that achieved with eight doses of conventional rbFSH. These findings suggest the potential to simplify treatment protocols, reducing both costs and handling-related challenges.

Several analytical tools were also developed, including polyclonal antibodies, a sandwich ELISA for hormone quantification, an optimized isoelectric focusing (IEF) method for glycosylation profiling, and a SEC-HPLC protocol for protein aggregate detection.

In summary, the strategy described in this work enabled the initial development of a production system for a novel hyperglycosylated rbFSH variant with enhanced *in vivo* biological activity, improved pharmacokinetic properties, and absence of LH activity, representing a promising alternative to commercial pituitary-derived porcine FSH preparations.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. Biofármacos

Los biofármacos representan una clase diversa de productos farmacéuticos que ha evolucionado hasta abarcar cualquier producto biológico producido por o a partir de organismos vivos utilizando tecnología de ADN recombinante, incluyendo las proteínas recombinantes terapéuticas, las vacunas y las terapias génicas y celulares (1,2). La gran mayoría de estos productos son versiones recombinantes de proteínas extracelulares eucariotas y, por lo tanto, muchas están sujetas a modificaciones postraduccionales (3). Desde que Humulin®, insulina humana recombinante producida en *Escherichia coli* (*E. coli*), fue aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA, *Food and Drug Administration*) en 1982 como la primera terapia basada en una proteína recombinante, la producción de biofármacos ha avanzado a pasos agigantados. Actualmente, este mercado está valorado en USD 400 mil millones y se estima que alcanzará los USD 621 mil millones para 2030 (4).

Las proteínas constituyen una clase extraordinaria de macromoléculas que cumplen funciones esenciales y diversas en prácticamente todos los procesos celulares del organismo (5,6). El desarrollo de la tecnología de ADN recombinante ha posibilitado la producción tanto de proteínas ya conocidas como de nuevas variantes mediante su expresión heteróloga en organismos hospedadores procariotas y eucariotas. La producción de proteínas recombinantes se inicia con la clonación del gen diana en un vector, el cual se introduce en el sistema de expresión correspondiente, seguida por la etapa de cultivo y producción (*upstream bioprocess*), y posteriormente por las etapas de purificación y formulación del producto final (*downstream bioprocess*). Cada una de estas fases requiere una serie de consideraciones específicas que deben ser optimizadas previamente a la producción a escala industrial, con el fin de maximizar la eficiencia en términos de costos, uso de recursos humanos e impacto ambiental (6).

2. Sistemas de expresión de proteínas recombinantes

La obtención de una proteína funcional depende estrechamente de la maquinaria celular del organismo que la produce. Se han evaluado diversos sistemas de expresión, tanto procariotas como eucariotas, en la búsqueda de estrategias eficientes y viables para la producción de proteínas (7). Entre ellos se incluyen bacterias, levaduras, células de insectos, células de mamíferos, así como plantas y animales transgénicos. Las principales diferencias entre los distintos sistemas de expresión radican en el rendimiento y la productividad proteica, la capacidad para realizar modificaciones postraduccionales, y, especialmente, en la aptitud para generar proteínas funcionales

que conserven las propiedades deseadas (3,6,8). La elección del sistema de expresión representa una de las decisiones más críticas en el desarrollo de proteínas terapéuticas. Desde el punto de vista científico, el principal factor que determina la idoneidad o limitación de los sistemas de expresión disponibles es, sin excepción, el tipo y la complejidad de las modificaciones postraduccionales requeridas por la proteína de interés (3). Aproximadamente el 40% de las proteínas recombinantes disponibles en el mercado biofarmacéutico carecen de modificaciones postraduccionales, en particular glicosilación, y suelen producirse en sistemas como *E. coli* o levaduras. En cambio, las glicoproteínas, especialmente aquellas con aplicaciones terapéuticas, se obtienen preferentemente mediante cultivos de células de mamíferos. Esto se debe a que otros sistemas, como levaduras, células de insectos, hongos filamentosos o plantas, generalmente no logran reproducir un perfil de glicosilación compatible con una función biológica adecuada (9).

2.1. Bacterias

E. coli es uno de los hospedadores más antiguos y utilizados para la producción de proteínas heterólogas (9). La popularidad de esta bacteria como sistema de expresión para la producción de proteínas recombinantes se relaciona con su facilidad de cultivo, su rápido crecimiento en condiciones de bajo costo, el amplio conocimiento de su genética y la abundancia de sistemas optimizados disponibles para la expresión de proteínas en este organismo. Sin embargo, la sobreproducción de proteínas recombinantes en *E. coli* no siempre es un proceso sencillo. El principal factor que dificulta el valor de esta bacteria como hospedador es la incapacidad de muchas proteínas heterólogas para plegarse adecuadamente, lo que a menudo lleva a su acumulación dentro de estructuras intracelulares compactas denominadas cuerpos de inclusión (10). Las proteínas que se dirigen hacia cuerpos de inclusión pueden estar inactivas e insolubles, por lo que se requiere de un proceso de renaturalización o *refolding* adicional, que usualmente tiende a ser complejo y no siempre garantiza la recuperación total de estructura y actividad (9).

2.2. Levaduras y hongos filamentosos

Las levaduras, organismos fúngicos eucariotas unicelulares, son comúnmente empleadas para la producción de proteínas recombinantes que no se expresan eficientemente en *E. coli*, debido a dificultades asociadas con el plegamiento correcto o la necesidad de glicosilación. Las cepas de levadura han sido ampliamente caracterizadas a nivel genético y poseen la capacidad de realizar diversas modificaciones postraduccionales. En comparación con células de insectos o

mamíferos, presentan ventajas operativas significativas, ya que son más fáciles de manipular, su cultivo es menos costoso y se adaptan con mayor facilidad a procesos de fermentación. Entre las especies más utilizadas se destacan *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) y la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) (9). Las levaduras y hongos filamentosos son organismos de fermentación industrial robustos que pueden crecer hasta alcanzar una alta densidad celular en medios químicamente definidos. Estos organismos comparten los pasos iniciales de la N-glicosilación de proteínas con los mamíferos; no obstante, las glicoproteínas derivadas de los sistemas de expresión fúngica contienen N-glicanos del tipo alta manosa, altamente inmunogénicos (11).

2.3. Células de insecto

Las células de insectos poseen una mayor capacidad para realizar modificaciones postraduccionales complejas y más similares a las de las células de mamífero en comparación con las levaduras y hongos. Además, cuentan con una maquinaria más eficiente para el correcto plegamiento de proteínas de origen mamífero, lo que las convierte en un sistema heterólogo adecuado para la expresión de este tipo de proteínas. El sistema de vectores más ampliamente utilizado en este contexto es el baculovirus. Una de sus principales ventajas radica en la capacidad de las células de insecto para alcanzar altas concentraciones de proteína recombinante. Asimismo, estas células pueden llevar a cabo diversas modificaciones postraduccionales, como fosforilación, N- y O-glicosilación, acilación, amidación y carboximetilación, lo que favorece el adecuado plegamiento de la proteína y la formación de puentes disulfuro, a diferencia de lo que ocurre en el citoplasma de *E. coli* (9). No obstante, la complejidad de las vías de N-glicosilación de proteínas en células de insecto es intermedia entre la observada en *S. cerevisiae* y en células de mamífero. Por otro lado, presentan niveles extremadamente bajos, de glicosiltransferasas terminales y, en algunos casos, incluso poseen actividad exoglicosidasa que compite eliminando la N-acetilglucosamina terminal del core del N-glicano, conduciendo a estructuras escasamente sialiladas (12).

2.4. Protozoos

En los últimos años, los protozoos han surgido como sistemas prometedores para la expresión heteróloga de proteínas eucariotas, particularmente por su capacidad de llevar a cabo modificaciones postraduccionales compatibles con las requeridas en mamíferos. Un ejemplo destacado es *Leishmania tarentolae* (*L. tarentolae*), un protozoo eucariota unicelular que fue introducido como sistema de expresión en 2002. Esta especie, perteneciente a la familia *Trypanosomatidae*, presenta la ventaja de no ser patógena para los mamíferos, lo que la convierte en una alternativa segura para

aplicaciones biotecnológicas. El desarrollo de métodos eficientes de cultivo, manipulación genética y transfección dio lugar a la creación del sistema LEXSY (*Leishmania expression system*), desarrollado por la empresa alemana Jena Bioscience y empleado desde entonces para la producción de diversas proteínas recombinantes. *L. tarentolae* destaca por su facilidad y bajo costo de manipulación, además de su capacidad de realizar modificaciones postraduccionales comparables a las observadas en células de mamíferos. En particular, su proceso de N-glicosilación se asemeja notablemente al humano; sin embargo, presenta una limitación importante: la ausencia de sialiltransferasas, lo que impide la producción de proteínas sialiladas, un aspecto crítico en muchas aplicaciones terapéuticas (13).

2.5. Células de mamífero

Los sistemas de expresión en células de mamíferos se emplean con frecuencia para la producción de proteínas que requieren modificaciones postraduccionales complejas, propias de organismos superiores. Estos cultivos celulares resultan particularmente útiles ya que permiten la obtención de proteínas con una conformación tridimensional, un plegamiento correcto y un perfil de glicosilación adecuado, lo que elimina la necesidad de procesos posteriores de renaturalización. Además, las células eucariotas son capaces de llevar a cabo otras modificaciones esenciales, como la adición de cadenas de ácidos grasos o la fosforilación de residuos hidroxilados de tirosina, treonina y serina. Entre las principales desventajas de este sistema se destacan su elevado costo en comparación con otros hospedadores, la posibilidad de contaminación con virus, y los niveles relativamente bajos de productividad. No obstante, en las últimas décadas se han logrado importantes avances en este aspecto: la productividad en cultivos de células de mamíferos aumentó de 50 mg.L⁻¹ en 1986 a 4,7 g.L⁻¹ en 2004, gracias a mejoras en las técnicas de ingeniería genética, el desarrollo de tecnologías avanzadas para el cultivo celular, y la optimización de los medios de cultivo (9).

2.6. Animales transgénicos

Los animales transgénicos han sido desarrollados como plataformas biológicas para la producción de proteínas recombinantes, las cuales pueden acumularse en diversos fluidos y tejidos como leche, clara de huevo, sangre, orina, plasma seminal e incluso en los capullos de gusanos de seda. Entre estos, la leche y la orina han demostrado ser los vehículos más prometedores para la recuperación de proteínas foráneas. Diversas especies, incluyendo cabras, ratones, vacas, cerdos, conejos y ovejas, así como algunos animales acuáticos, están siendo utilizadas con este fin. La

expresión dirigida a las glándulas mamarias ha permitido alcanzar concentraciones elevadas de proteínas recombinantes en la leche. No obstante, entre las principales desventajas de estos sistemas se encuentran los tiempos de producción y los costos asociados al mantenimiento de animales (9).

2.7. Plantas transgénicas

El uso de plantas transgénicas como plataformas para la producción de proteínas recombinantes representa una alternativa altamente segura, rentable y eficiente en comparación con animales transgénicos y cultivos celulares de mamíferos. Este sistema no solo reduce significativamente los costos y el tiempo de producción, sino que también ofrece ventajas superiores en términos de almacenamiento y distribución. Las plantas presentan múltiples beneficios frente a otros sistemas de expresión, entre los que se destacan: la capacidad de acumular altos niveles de proteína en sus tejidos, la producción eficiente de proteínas con estructuras y plegamientos adecuados, la posibilidad de formar complejos multiméricos y de incorporar modificaciones postraduccionales, la facilidad de escalado a nivel agrícola, la simplicidad y bajo costo de los procesos de purificación, y el bajo riesgo de contaminación con patógenos animales. Además, su cultivo requiere únicamente agua, minerales y luz solar, lo que contrasta notablemente con los exigentes requerimientos de los cultivos celulares de mamíferos, los cuales dependen de biorreactores altamente especializados, cuyo costo puede ascender a varios cientos de millones de dólares cuando la producción se lleva a escala comercial. Sin embargo, uno de los principales desafíos en el uso de plantas como sistemas de expresión recombinante es el perfil de glicosilación. Las plantas realizan modificaciones postraduccionales diferentes a las de los mamíferos, en particular en la N-glicosilación, donde pueden aparecer azúcares como la $\beta(1,2)$ -xilosa o $\alpha(1,3)$ -fucosa, que son potencialmente inmunogénicos para mamíferos (9,14).

3. Tecnología de cultivo de células de mamífero

3.1. Tipos de cultivos celulares

El cultivo de células animales puede clasificarse en distintos tipos, cada uno con características específicas. Los cultivos primarios se obtienen a partir de tejidos animales normales y pueden establecerse mediante cultivo de explante o, tras digestión enzimática, como suspensiones celulares individuales. Las células primarias aisladas se clasifican en dos grandes grupos: células adherentes, que requieren una superficie para fijarse y crecer, y células en suspensión, que proliferan libremente en el medio de cultivo. Las primeras suelen derivarse de tejidos sólidos, donde permanecen ancladas a la matriz extracelular, mientras que las células en suspensión tienen origen en el

sistema hematopoyético. Cuando un cultivo primario es subcultivado (es decir, transferido a un nuevo recipiente con medio fresco), da lugar a lo que se conoce como línea celular. Estas líneas celulares primarias poseen una capacidad limitada de crecimiento *in vitro*, durante la cual tienden a conservar muchas de las características fisiológicas propias de su entorno *in vivo*. En el ámbito biofarmacéutico, ciertas líneas celulares primarias, como los fibroblastos de embrión de pollo, se emplean en la producción de vacunas virales. Además, estas líneas tienen aplicaciones emergentes en el desarrollo de terapias celulares, y se utilizan extensamente en investigación básica, descubrimiento de fármacos y ensayos biológicos (15).

Las células normales presentan una capacidad limitada de división, tras la cual pierden su potencial proliferativo. No obstante, algunas células pueden adquirir la capacidad de dividirse indefinidamente mediante un proceso denominado transformación, el cual puede ocurrir de manera espontánea o ser inducido por agentes químicos o virales. Cuando una línea celular finita atraviesa este proceso, se convierte en una línea celular continua. Durante la transformación, las células suelen perder muchas de las características propias de su estado *in vivo*; sin embargo, adquieren la ventaja de poder mantenerse en cultivo de manera indefinida, lo que las convierte en herramientas valiosas para la investigación y la producción biofarmacéutica. En la literatura, estas líneas celulares continuas suelen mencionarse simplemente como “líneas celulares”. Las líneas celulares continuas pueden crecer en suspensión, como células individuales o formando pequeños agregados, o bien adherirse a una superficie sólida. En un contexto de producción a gran escala, las líneas celulares en suspensión son preferidas debido a su facilidad de manejo y a la simplicidad para escalar los procesos. Por esta razón, siempre que es posible, los cultivos de producción se adaptan al crecimiento en suspensión (15).

3.2. Cultivo de células de mamífero en biorreactor

Las células pueden cultivarse en recipientes que contienen un medio de crecimiento líquido adecuado, en los cuales pueden crecer adheridas como una monocapa, unidas a *microcarriers*, atrapadas en matrices tridimensionales o directamente en suspensión. El método de cultivo seleccionado determinará la escala y la complejidad de los procesos posteriores de separación y purificación. El cultivo a escala de producción se realiza habitualmente en biorreactores, siendo el tanque agitado el diseño más utilizado debido a su confiabilidad, amplio conocimiento en su manejo y potencial para la ampliación del proceso (16).

El modo de operación más sencillo es probablemente el biorreactor por lotes (*batch*). En este modo, luego de la inoculación, las células crecen y producen hasta que

se alcanza una limitación causada por el agotamiento de los nutrientes del medio y la acumulación de productos de desecho, como el lactato y amonio, lo que provoca que la densidad celular comience a disminuir. El producto de interés se acumula en el biorreactor y es recolectado al final del proceso (16,17).

El segundo modo más común es el de lotes alimentados (*fed-batch*), en el cual se suplementa al biorreactor con un sustrato que contiene los nutrientes limitantes necesarios durante la fase de crecimiento celular y/o la fase de producción. Al igual que en el proceso por lotes, los productos de desecho se acumulan en el biorreactor y el producto se recolecta al final del proceso. El proceso por lotes alimentados permite alcanzar mayores densidades celulares y rendimientos de producto en comparación con el proceso por lotes debido a la extensión del tiempo de producción que se puede lograr (16).

Finalmente, el tercer modo de operación es el proceso continuo, el cual consiste en un sistema de biorreactor en el que el medio de cultivo o los nutrientes se añaden de manera continua como corriente de entrada al sistema, mientras que la cosecha, que contiene el producto, se retira de simultáneamente como corriente de salida. En los procesos continuos para cultivos celulares se suelen utilizar dispositivos de retención celular acoplados al biorreactor, que separan y retienen la mayoría de las células en el sistema, permitiendo recolectar la cosecha conteniendo el producto libre de células. Este modo de operación se conoce como proceso continuo en modo de perfusión. Al operar bajo este régimen, los niveles de los productos de desecho se mantienen constantes, generando un entorno estable que favorece el crecimiento celular y la producción. De esta manera, se logran alcanzar densidades celulares mucho más altas y, en consecuencia, una mayor productividad (16–18).

3.3. Líneas celulares de mamífero utilizadas para la producción de proteínas recombinantes para uso terapéutico

La línea celular CHO (*Chinese Hamster Ovary cell*) constituye el sistema de producción predominante para la expresión de proteínas recombinantes en células animales. Esto puede atribuirse a una combinación de factores, como los éxitos iniciales en la producción de proteínas recombinantes, su facilidad de cultivo y manipulación, la amplia aceptación por parte de agencias regulatorias y su elevada capacidad de expresión. A partir de la línea CHO original se han generado múltiples subclones, entre los cuales se destacan CHO-K1, CHO-DG44 y CHO-S. Otras líneas celulares de mamíferos no humanos también se han utilizado para la producción farmacéutica a gran escala. Entre ellas se incluyen las líneas de mieloma murino NS0 y Sp2/0, células de riñón de hámster bebé (BHK, *Baby Hamster Kidney*), células de riñón de mono verde

africano (Vero) y células de riñón canino Madin-Darby (MDCK, *Madin-Darby Canine Kidney*). Las líneas Vero y MDCK se emplean principalmente en la producción de vacunas, mientras que las demás se utilizan mayoritariamente para la expresión de proteínas recombinantes (15).

El uso de líneas celulares humanas en la industria biofarmacéutica ha sido relativamente limitado, a pesar de la existencia de diversas opciones disponibles. Hasta la fecha, la mayoría de los productos biofarmacéuticos recombinantes se han generado utilizando líneas celulares de hámster y mieloma murino. Solo tres líneas celulares humanas han sido utilizadas para la producción de productos bioterapéuticos recombinantes: las células de linfoma Namalwa, las células HEK 293 de riñón embrionario humano y la línea de fibrosarcoma HT-1080 (15).

Desde su establecimiento, las células HEK 293 han sido ampliamente empleadas en la producción de proteínas recombinantes. Existen variantes desarrolladas a partir de la línea original, como las 293N3S, adaptadas para crecimiento en suspensión en biorreactores, o la línea 293S, cultivada en medios libres de suero. Otras variantes, como las HEK 293T, que expresan el antígeno T del virus SV40, y las 293-E, que expresan la proteína EBNA1 del virus Epstein-Barr, permiten una expresión proteica prolongada luego de transfecciones transitorias, gracias a la replicación episomal de los plásmidos transfectados (19). En la actualidad, las células HEK se utilizan extensamente para la expresión transitoria de proteínas recombinantes en investigación básica y estudios preclínicos, así como también para la producción de vectores virales como adenovirus, lentivirus, retrovirus y virus adenoasociados (15).

4. Transferencia de material genético

Las membranas celulares no permiten la incorporación espontánea de ácidos nucleicos exógenos debido a la naturaleza polar de la bicapa lipídica, que actúa como una barrera natural frente a la entrada de la mayoría de las moléculas hidrosolubles, como los ácidos nucleicos. En la actualidad, se dispone de una amplia gama de metodologías y reactivos que permiten la introducción de diferentes tipos de moléculas en el interior de células eucariotas. En el caso específico del ADN, existen tres estrategias principales para su incorporación: i) infección, ii) transducción y iii) transfección. Las dos primeras se basan en mecanismos biológicos mediados por virus, mediante procesos de infección viral dependientes de receptores celulares. En cambio, la transfección se refiere al uso de métodos físicos o bioquímicos para facilitar la entrada del ADN en las células (20).

4.1. Transfección

En sistemas de mamíferos, se realizan de manera rutinaria dos tipos de transfección: transitoria y estable (o permanente). La elección entre una y otra generalmente depende de los objetivos experimentales y del tipo de célula (21). Las células transfectadas de forma transitoria expresan el gen de interés o transgén (TG), pero no lo integran en su genoma. Como consecuencia, el nuevo material genético no se replica junto con el ADN celular. La expresión del transgén se mantiene solo por un período limitado, usualmente de algunos días, tras lo cual se pierde como resultado de la división celular o por degradación intracelular. La transfección transitoria se emplea comúnmente en estudios que requieren la expresión a corto plazo de genes o productos génicos, como por ejemplo en ensayos de silenciamiento génico mediante ARN interferente o para la producción de proteínas a pequeña escala (21). La transfección estable implica la expresión sostenida a largo plazo de un TG, ya sea mediante su integración en el genoma nuclear del huésped o a través del mantenimiento de un vector episomal como elemento extracromosómico en el núcleo. La característica distintiva de esta estrategia es que el transgén se replica junto con el ADN celular, lo que garantiza su transmisión a las células hijas durante la división celular. De esta manera, se generan líneas celulares que expresan de forma estable el gen introducido. Este tipo de transfección es fundamental para aplicaciones que requieren expresión génica prolongada, como la producción a gran escala de proteínas recombinantes, estudios sobre regulación génica sostenida, generación de líneas celulares estables y desarrollos en terapia génica (21).

Los métodos de transfección se suelen clasificar en físicos (como la microinyección y la electroporación) y químicos (como la transfección mediante fosfato de calcio, lípidos o polímeros catiónicos). La microinyección permite una dosificación precisa de material genético o proteínas directamente en el citoplasma o núcleo, alcanzando eficiencias cercanas al 100 % y con baja citotoxicidad, aunque su capacidad de procesamiento es limitada, lo que reduce su practicidad. La electroporación, basada en la aplicación de pulsos eléctricos de alto voltaje, genera poros transitorios en la membrana que facilitan la entrada de moléculas con alta eficiencia, pero presenta una elevada citotoxicidad, lo que limita su uso en células sensibles. El método de fosfato de calcio, uno de los más antiguos y económicos, aprovecha la formación de complejos ADN-fosfato de calcio que las células incorporan por endocitosis o fagocitosis; sin embargo, su reproducibilidad es baja debido a su sensibilidad al pH y puede inducir mutaciones en el ADN transfectado. Por su parte, la transfección mediada por lípidos catiónicos (lipofección) es ampliamente empleada por su versatilidad y compatibilidad

con distintos tipos celulares. El mecanismo de internalización de los complejos lípido-ácido nucleico suele involucrar endocitosis, seguida de la liberación del contenido al citoplasma (Figura 1). Esta técnica presenta una alta eficiencia y es compatible con una gran variedad de tipos celulares, desde células primarias hasta líneas celulares cultivadas en suspensión o en adherencia. Además, permite la incorporación de diferentes tipos de biomoléculas, como ADN, ARN y proteínas, y puede aplicarse tanto para transfección transitoria como estable. Sin embargo, su eficiencia está influenciada por múltiples factores, incluyendo calidad y cantidad del ADN, proporción reactivo:ADN, tiempo de incubación de los complejos y la densidad celular al momento de la transfección. Finalmente, los polímeros catiónicos, como la polietilenimina (PEI), permiten condensar y proteger el ADN formando complejos estables de carga positiva que favorecen su internalización y expresión, ofreciendo un balance atractivo entre eficiencia, costo y capacidad de superar barreras intracelulares (21,22).

En conjunto, la elección del método de transfección dependerá de factores como el tipo celular, la naturaleza del material a transferir y el equilibrio buscado entre eficiencia, viabilidad y reproducibilidad experimental.

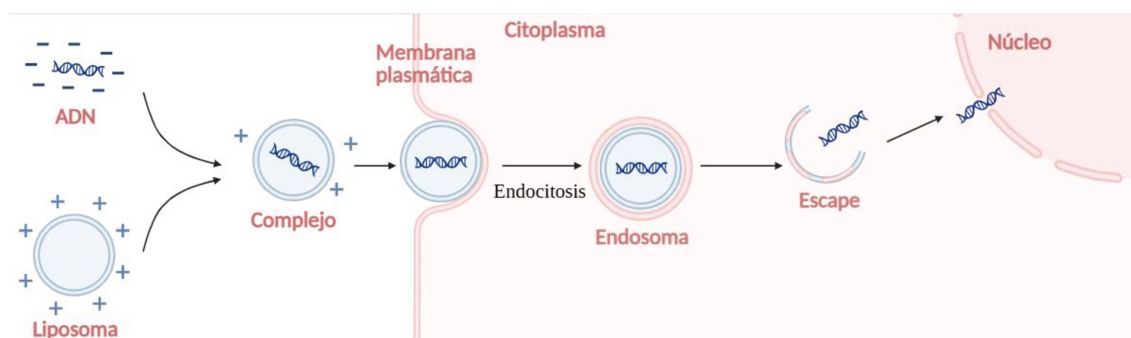


Figura 1. Representación esquemática del proceso de transfección mediante lípidos catiónicos.

4.2. Transducción

Otra metodología para la transferencia de material genético es la utilización de vectores virales recombinantes. Entre ellos, los vectores lentivirales (LVs, *lentiviral vectors*), pertenecientes a la familia Retroviridae (retrovirus), se emplean ampliamente tanto en investigación como en terapia génica, debido a su capacidad para transducir tanto células en división como en estado quiescente, integrándose preferentemente en regiones de eucromatina. Además, presentan un elevado tropismo hacia distintos tipos celulares (23). Los LVs se han desarrollado a partir de diversos lentivirus, siendo el derivado del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) el más estudiado y utilizado en la actualidad. Inicialmente, su uso requería estrictas medidas de

bioseguridad ante la posibilidad de generar partículas lentivirales competentes para la replicación (RCLs, *replication competent lentivirus*). Con el objetivo de minimizar este riesgo y mejorar la eficiencia del sistema, se han diseñado diferentes “generaciones” de vectores lentivirales (23). Desde la primera generación utilizada en ensayos de terapia génica hasta la actual tercera generación, se han eliminado genes accesorios y regulatorios no esenciales para el ensamblaje de la partícula viral, y se han distribuido las secuencias estructurales en distintos plásmidos, disminuyendo así al mínimo la posibilidad de recombinación y la eventual formación de un microorganismo viable (24). El sistema lentiviral de tercera generación consta de dos componentes principales: el plásmido lentiviral de transferencia (pLV), que contiene el TG de interés, y el sistema de empaquetamiento, compuesto por plásmidos auxiliares que codifican las proteínas estructurales necesarias (Figura 2).

El vector de transferencia incluye todas las secuencias necesarias para la expresión del transgén, así como las secuencias *cis*-actuantes requeridas para el ensamblaje correcto de las partículas lentivirales (25,26). A continuación, se describen las regiones más relevantes del vector:

- **LTRs (*Long terminal repeats*)**: se localizan en los extremos del ADN proviral y funcionan como promotores y/o potenciadores (*enhancers*) de la transcripción del ARN viral. En los vectores de tercera generación, el LTR 5' ha sido modificado reemplazando el promotor dependiente de *tat* del HIV-1 por un promotor constitutivo derivado del virus del sarcoma de Rous, mientras que el LTR 3' fue mutado para generar un vector auto-inactivante (SIN, *self-inactivating vector*), con el fin de reducir la posibilidad de transactivación no deseada tras la integración.
- **Ψ (*Psi*)**: secuencia de empaquetamiento necesaria para la incorporación del ARN genómico en las partículas virales durante la fase de ensamblaje.
- **RRE (*Rev response element*)**: secuencia reconocida por la proteína Rev, que promueve la exportación del ARN viral desde el núcleo al citoplasma.
- **cPPT (*Central polypurine tract*)**: región rica en purinas que favorece la retrotranscripción y mejora la eficiencia de transducción al facilitar la entrada del ADNc al núcleo.
- **Promotor**: Encargado de dirigir la expresión del transgén.
- **WPRE (*Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element*)**: elemento regulador postranscripcional que incrementa la estabilidad y eficiencia de traducción del ARN mensajero.

Por otro lado, el sistema de empaquetamiento lentiviral de tercera generación está constituido por plásmidos auxiliares que codifican en *trans* las proteínas virales necesarias para la producción de partículas virales competentes para la transducción, pero no para la replicación. Estos plásmidos son:

- **pMDLg/pRRE:** codifica la poliproteína estructural Gag y la enzima Pol (retrotranscriptasa), además de incluir una secuencia RRE.
- **pRSV-Rev:** expresa la proteína Rev, fundamental para la exportación nuclear del ARN viral que contiene la secuencia RRE, presente tanto en el plásmido pMDLg/pRRE como en el plásmido de transferencia (pLV).
- **pVSV-G** (u otro plásmido codificante para una glicoproteína de envoltura): proporciona la glicoproteína de superficie viral necesaria para la entrada del vector en las células blanco. La glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) es la más utilizada, debido a su amplio tropismo y elevada estabilidad.

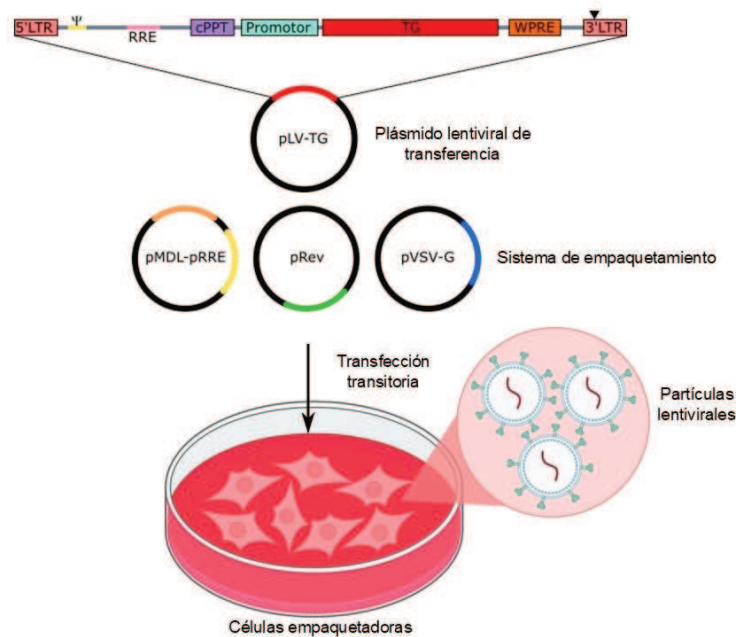


Figura 2. Sistema de vectores lentivirales de tercera generación. En la parte superior se representa un detalle del vector lentiviral de transferencia (pLV-TG), el cual posee la secuencia del transgén de interés (TG) regulado bajo la actividad de un promotor, una secuencia de regulación postranscripcional (WPRE), una región rica en purinas (cPPT) como así también el resto de las secuencias cis-actantes para el ensamblado de la partícula viral. LTR: *long terminal repeat*. RRE: *Rev response element*. Ψ : secuencia de empaquetamiento. $\blacktriangledown$: *self-inactivating mutation* (SIN). En la parte inferior se esquematiza el ensamblado de vectores lentivirales mediante transfección transitoria de células empaquetadoras.

5. Glicosilación de proteínas

La mayoría de las proteínas de origen eucariota experimentan modificaciones covalentes durante o después de su síntesis ribosómica. Estas modificaciones se

agrupan en dos categorías: modificaciones cotraduccionales y postraduccionales; sin embargo, ambas suelen englobarse bajo el término general de modificaciones postraduccionales de proteínas (PTM, *post-translational modifications*). Hasta la fecha, se han caracterizado cientos de PTM (27,28), las cuales afectan invariablemente alguna propiedad estructural o funcional de la proteína modificada. La mayoría de estas modificaciones son catalizadas por enzimas específicas, que actúan sobre proteínas diana a través de rutas bioquímicas bien definidas. Algunas PTM, como la glicosilación, están ampliamente distribuidas y son frecuentes, mientras que otras, como la AMPilación, ocurren con menor frecuencia. Ciertas modificaciones se asocian predominantemente con proteínas intracelulares, como la fosforilación y la ADP-ribosilación; en cambio, otras son características principalmente de proteínas extracelulares, como la glicosilación, la formación de enlaces disulfuro y la carboxilación (3).

Entre todas ellas, la glicosilación es la PTM más prevalente y estructuralmente compleja que ocurre de forma natural en proteínas. La biosíntesis de glicanos tiene lugar en el retículo endoplasmático (RE) y el aparato de Golgi, y requiere la acción coordinada de numerosas enzimas transmembrana específicas, principalmente glicosiltransferasas y glicosidasas. Esta modificación impacta de forma significativa en diversas propiedades proteicas, como su conformación tridimensional, estabilidad, solubilidad, farmacocinética, actividad biológica *in vivo* e incluso su inmunogenicidad. Los glicanos unidos a glicoproteínas suelen estar compuestos por cadenas ramificadas de hasta una docena de monosacáridos. Según el tipo de enlace que establecen con la proteína, se clasifican en dos grandes grupos: N-glicanos, que se unen al átomo de nitrógeno del grupo amida en las cadenas laterales de asparagina (Asn); y O-glicanos, que se enlazan al átomo de oxígeno de los grupos hidroxilo de las cadenas laterales de serina (Ser) o treonina (Thr) (29).

5.1. N-glicosilación

La N-glicosilación es una modificación postraducciona esencial en eucariotas, que comienza en el retículo endoplasmático y continúa a lo largo del aparato de Golgi. Esta modificación se produce en polipéptidos que presentan la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr (donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina), mediante la transferencia de un oligosacárido preensamblado altamente conservado: Glc₃Man₉GlcNAc₂ (29–31).

La biosíntesis del glicano precursor se inicia en el lado citosólico de la membrana del RE, donde el lípido dolicol fosfato (Dol-P) actúa como anclaje. Primero se unen dos residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y cinco de manosa (Man), formando

Man₅GlcNAc₂-Dol, el cual se transloca al lumen del RE. Allí se incorporan cuatro residuos adicionales de manosa y tres de glucosa (Glc), completando la síntesis del precursor Glc₃Man₉GlcNAc₂ (29,31). Este oligosacárido se transfiere en bloque a un residuo de asparagina (Asn) en la cadena polipeptídica naciente mediante el complejo oligosacariltransferasa (OST), antes de que la proteína se pliegue completamente (29–31). Luego, el glicano unido a la proteína sufre una serie de modificaciones secuenciales en el lumen del RE. Las glucosidasas I y II eliminan progresivamente los tres residuos de glucosa terminales, proceso que está estrechamente asociado al control de calidad del plegamiento proteico, ya que permite la interacción con chaperonas del RE. A continuación, la α -manosidasa I del RE elimina un residuo de manosa, generando un isómero de Man₈GlcNAc₂. Las proteínas mal plegadas son reconocidas por las proteínas EDEM, que las dirigen a la degradación (29,31). Todo este procesamiento se encuentra esquematizado en la Figura 3.

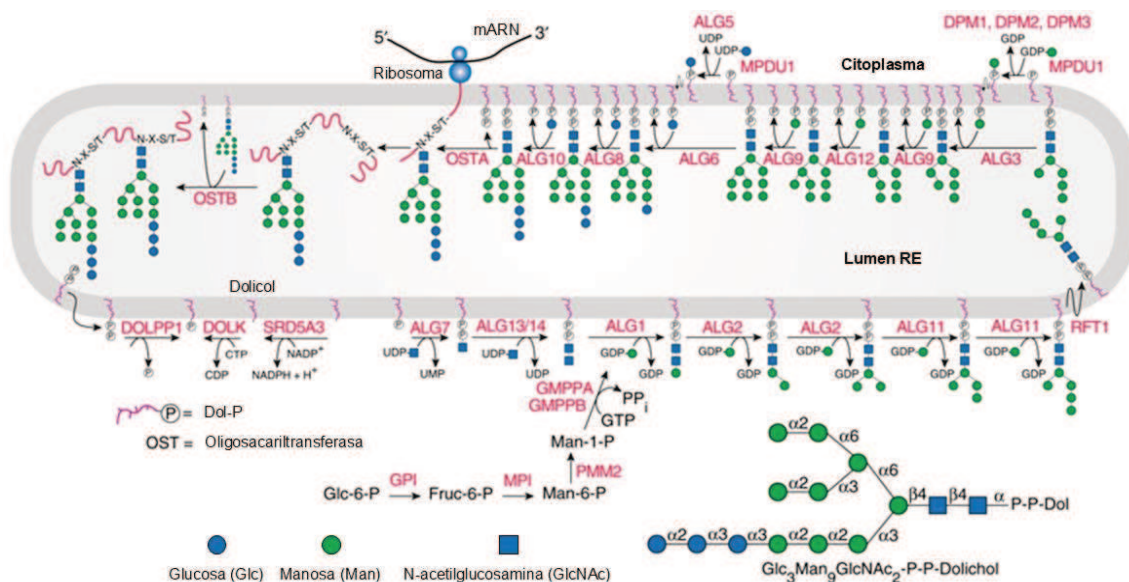


Figura 3. Vía de síntesis del precursor dolicol-glicano de los N-glicanos y su transferencia a los residuos de asparagina (Asn-X-Thr/Ser) de la proteína naciente por el complejo oligosacariltransferasa (OST). Figura adaptada de Stanley y col., 2015 (31).

Si las glicoproteínas se encuentran correctamente plegadas, abandonan el RE y se dirigen al cis-Golgi (Figura 4), donde comienza el procesamiento más complejo del N-glicano. En esta región, actúan las α 1-2 manosidasas, que recortan residuos de manosa para formar Man₅GlcNAc₂. Este compuesto es un intermediario clave para la formación de N-glicanos híbridos y complejos. Algunos N-glicanos pueden escapar de este procesamiento y conservar estructuras de tipo oligomanosa, como Man₅₋₉GlcNAc₂ (29,31).

En el medial-Golgi (Figura 4), el N-glicano $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ es modificado por la N-acetilglucosaminiltransferasa I (GlcNAc-TI), que añade un residuo de GlcNAc a la manosa $\alpha 1-3$ del *core*. Este paso permite la acción posterior de la α -manosidasa II, que elimina las manosas remanentes $\alpha 1-3$ y $\alpha 1-6$, formando $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$. Posteriormente, la GlcNAc-TII incorpora un segundo GlcNAc a la manosa $\alpha 1-6$, generando el precursor $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ de los N-glicanos complejos biantenarios (29,31). A partir de esta estructura central, se puede generar una diversidad de glicanos complejos mediante la adición de nuevas ramificaciones. GlcNAc-TIV y GlcNAc-TV agregan ramificaciones adicionales a las manosas centrales, produciendo glicanos triantenarios y tetraantenarios. También pueden incorporarse residuos de GlcNAc bisectantes mediante la acción de GlcNAc-TIII, los cuales se unen a la β -manosa del *core* e influyen en el reconocimiento por lectinas y la regulación de otros procesos celulares (29,31). Además, se pueden realizar modificaciones adicionales en el *core* del N-glicano. En vertebrados, una modificación común es la adición de residuos de fucosa en enlaces $\alpha 1-3$ (fucosilación) de la GlcNAc unida a Asn mediante una fucosiltransferasa. En plantas e invertebrados pueden añadirse residuos de fucosa en enlaces $\alpha 1-3$, y en algunas especies se incorpora xilosa en posición $\beta 1-2$ a la manosa central (31).

En el trans-Golgi (Figura 4), las ramificaciones de los N-glicanos complejos son elongadas por la adición de disacáridos tipo N-acetil-lactosamina (LacNAc), generando estructuras repetidas (poli-LacNAc). Adicionalmente, se pueden añadir azúcares terminales como ácido siálico, fucosa, galactosa, GlcNAc o grupos sulfato, formando una gran variedad de glicanos maduros que participan en reconocimiento celular, tráfico vesicular, inmunidad y otras funciones biológicas (29,31).

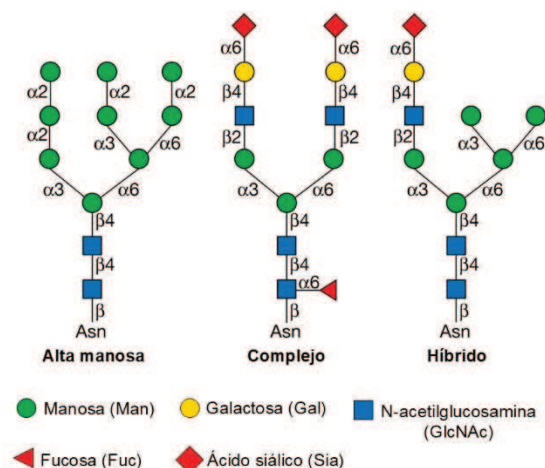


Figura 5. Ejemplificación de la diversidad de estructuras de N-glicanos. Figura adaptada de Stanley y col., 2015 (31).

5.2. O-Glicosilación

En marcado contraste con la N-glicosilación, la mayoría de los eventos de O-glicosilación ocurren en el aparato de Golgi y tienen lugar después del plegamiento de la proteína. A diferencia de los N-glicanos, que se transfieren en bloque desde un precursor lipídico, los O-glicanos se ensamblan de forma secuencial mediante la acción de una amplia variedad de glicosiltransferasas, que añaden los monosacáridos uno por uno a residuos de serina o treonina (Ser/Thr) en distintas regiones de la proteína (32). La O-glicosilación puede iniciarse por la incorporación de diversos monosacáridos, como N-acetilgalactosamina (GalNAc), fucosa, glucosa, xilosa o manosa. La adición de GalNAc es la más común y da origen a un subtipo de glicanos denominado O-GalNAc u O-glicanos tipo mucina. Estos glicanos son característicos de proteínas altamente glicosiladas como las mucinas, aunque también se encuentran en muchas otras glicoproteínas de superficie (32,33).

La síntesis de los glicanos O-GalNAc se inicia con la transferencia del monosacárido GalNAc desde el sustrato UDP-GalNAc a un residuo Ser o Thr de la proteína, catalizada por enzimas de la familia polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa (GALNT). Esta reacción forma una estructura básica denominada antígeno Tn (GalNAc-O-Ser/Thr), la cual, aunque escasa en mucinas normales, se detecta frecuentemente en mucinas tumorales y es considerada un marcador de malignidad (32,33).

La modificación posterior del antígeno Tn puede dar lugar a una diversidad de glicanos complejos (Figura 6). Por ejemplo, la sialilación del GalNAc por acción de una sialiltransferasa α 2-6 produce el antígeno sialil-Tn, otra estructura comúnmente sobreexpresada en tumores avanzados. La adición de una galactosa (Gal) en β 1-3 al GalNAc genera el core 1, también conocido como antígeno T. Este puede ser sialilado

en la Gal para formar glicanos sialil-core 1, o recibir una segunda sialilación en la GalNAc para generar glicanos disialil-core 1 (32,33).

La incorporación de una ramificación con GlcNAc en β 1-6 al GalNAc del core 1 genera glicanos del core 2, una estructura extendida que permite mayor diversidad estructural y funcional. Por otro lado, la adición directa de GlcNAc en β 1-3 al GalNAc del antígeno Tn origina el core 3, el cual puede ser ramificado por GlcNAc β 1-6 para generar glicanos del core 4 (32,33).

Los glicanos del core 1 y 2 son los más comunes en proteínas que no son mucinas, mientras que los core 3 y 4 son más frecuentes en mucinas secretadas o transmembrana. Sin embargo, existen excepciones, y estos últimos también pueden encontrarse en otras glicoproteínas bajo ciertas condiciones fisiológicas o patológicas (33).

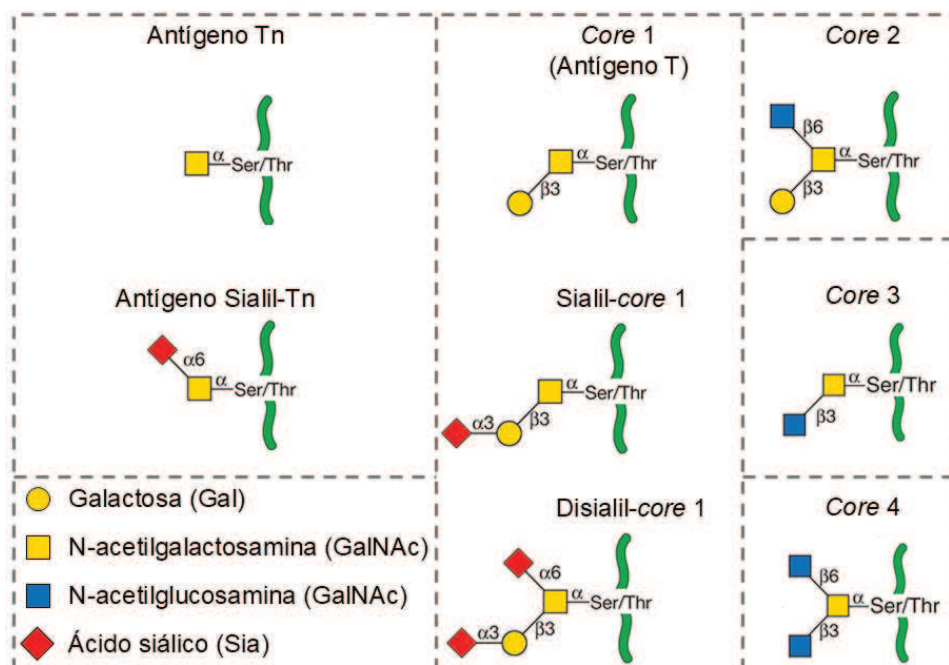


Figura 6. Ejemplificación de la diversidad de estructuras de O-glicanos. Figura adaptada de Thompson y Wakarchuk, 2022 y Brockhausen y Stanley, 2017 (32,33).

5.3. Factores que afectan la glicosilación de las proteínas terapéuticas

La glicosilación es una de las PTM que más contribuyen a la heterogeneidad estructural de las glicoproteínas terapéuticas, representando un desafío significativo en su desarrollo y control de calidad (34). La diversidad estructural de los oligosacáridos presentes en las glicoproteínas es enorme, ya que su biosíntesis implica la acción coordinada de numerosas enzimas y carece de un mecanismo de corrección de errores. Esta complejidad hace que la estructura final del glicano no dependa únicamente de la secuencia primaria del polipéptido, sino también de múltiples factores variables, como la disponibilidad de sustratos y de enzimas (glicosidasas y glicosiltransferasas), cuya

expresión puede cambiar durante el crecimiento, la diferenciación y el desarrollo celular (35).

Dado que la glicosilación también se encuentra influenciada por diversos parámetros del proceso de producción, resulta esencial controlar y/o manipular estos factores para garantizar la calidad del producto (29). En la producción de proteínas recombinantes con fines terapéuticos, es fundamental mantener un perfil de glicosilación consistente entre lotes, ya que las glicoproteínas se sintetizan como una población de diferentes glicoformas: variantes estructurales de glicanos unidas a una misma secuencia polipeptídica (36). Estas variaciones pueden manifestarse como macroheterogeneidad, cuando difiere la ocupación de los sitios de glicosilación, o como microheterogeneidad, cuando varía la estructura de los glicanos unidos. Esta última se ve particularmente afectada por parámetros del cultivo celular como el contenido de nutrientes, el pH, la temperatura, la disponibilidad de oxígeno o la acumulación de metabolitos como el amoníaco, todos los cuales pueden alterar la distribución de las estructuras de glicanos en la proteína recombinante final (36).

5.3.1. Tipo celular y factores específicos de especie

La elección del sistema hospedador más adecuado depende tanto del tipo de proteína terapéutica como de su aplicación clínica. Algunas proteínas, como la insulina o la hormona de crecimiento humana, no requieren glicosilación para ser funcionales. Sin embargo, la mayoría de las terapias aprobadas o en desarrollo comprenden glicoproteínas, cuya actividad biológica depende en gran medida de una glicosilación adecuada (29). Por esta razón, la selección del sistema de expresión constituye una de las decisiones más críticas en el desarrollo de proteínas terapéuticas recombinantes (3).

Por ejemplo, la expresión de una proteína normalmente glicosilada en *E. coli* produce exclusivamente formas aglicosiladas, debido a la ausencia de la maquinaria necesaria para realizar glicosilaciones. En contraste, los sistemas de expresión basados en levaduras suelen generar glicoproteínas con glicanos de alto contenido de manosa, lo que puede comprometer su vida media plasmática y limitar su eficacia terapéutica. De forma similar, los sistemas vegetales tienden a producir proteínas hiperglicosiladas con residuos de xilosa y fucosa, estructuras que pueden inducir respuestas inmunogénicas en mamíferos. En este contexto, las células CHO y otras líneas celulares de mamíferos representan la opción preferida para la producción de glicoproteínas terapéuticas, principalmente debido a su capacidad para llevar a cabo modificaciones postraduccionales complejas, incluida la glicosilación, de forma apropiada (3).

5.3.2. Factores ambientales y condiciones de cultivo

Diversos parámetros del cultivo pueden ser manipulados durante la producción de bioterapéuticos con el fin de optimizar tanto el crecimiento celular como la productividad volumétrica. Sin embargo, estas modificaciones pueden impactar significativamente sobre las características glicosídicas del producto final, lo que resalta la necesidad de un control preciso del proceso (29,36). Estos parámetros se agrupan en tres categorías principales: el medio de cultivo y sus nutrientes, las condiciones de cultivo, y las plataformas tecnológicas utilizadas.

5.3.3. Medio de cultivo y nutrientes

El medio de cultivo influye directamente en el crecimiento celular y, por ende, en la calidad del producto final (37,38). Generalmente, se compone de una combinación de componentes químicamente definidos e indefinidos. La limitación de glucosa, principal fuente de energía puede inducir anomalías en la glicosilación de las proteínas. La glutamina, por su parte, es una fuente adicional de energía y un precursor clave en la síntesis de nucleótidos, pero su metabolismo genera amonio, cuya acumulación afecta negativamente tanto la viabilidad celular como la glicosilación, especialmente al reducir la incorporación de ácido siálico terminal. Aunque la suplementación con suero animal favorece el crecimiento celular, presenta desventajas como la variabilidad entre lotes, dificultades en la purificación, alto costo y riesgo de transmisión de patógenos. Por ello, es común adaptar los cultivos a medios libres de suero, lo que mejora la seguridad y reproducibilidad del proceso, aunque este cambio puede afectar la productividad y el patrón de glicosilación (29,36).

5.3.4. Condiciones de cultivo

La optimización de parámetros como el oxígeno disuelto, la temperatura, el pH y la concentración de CO₂ es clave para maximizar la productividad, pero también impacta sobre la glicosilación. El oxígeno disuelto tiene un efecto importante sobre el metabolismo celular y, dependiendo de la línea celular y la proteína expresada, puede modificar la galactosilación y la sialilación. El pH influye tanto en la adición de galactosa y ácido siálico como en la ocupación de sitios potenciales de glicosilación. El CO₂, al intervenir en el equilibrio del pH, también debe ser cuidadosamente controlado. Asimismo, la reducción de la temperatura del cultivo por debajo de 37 °C ha demostrado aumentar la productividad en algunos casos, aunque puede alterar el nivel de sialilación de las proteínas (29,36).

5.3.5. Plataformas tecnológicas

Como se describió anteriormente, las estrategias de cultivo más utilizadas incluyen los modos *batch*, *fed-batch* y perfusión. En el modo *batch*, los nutrientes se consumen progresivamente, provocando cambios en las condiciones de cultivo que pueden alterar el patrón de glicosilación de las proteínas acumuladas. En *fed-batch*, si bien los nutrientes se suministran de forma controlada, el producto se acumula y queda expuesto a enzimas secretadas o liberadas por la lisis celular, lo cual puede alterar su glicosilación. El sistema de perfusión, en cambio, permite una renovación continua del medio y una rápida cosecha del producto, lo que reduce la heterogeneidad de las glicoformas y, en general, mejora la calidad del bioterapéutico. Aunque algunos procesos pueden realizarse con cultivos adherentes, en la mayoría de los casos se prefiere adaptar las células al crecimiento en suspensión para facilitar la escalabilidad (29,36).

5.4. Impacto de la glicosilación sobre las propiedades de las proteínas

Los oligosacáridos ejercen una influencia determinante sobre numerosas propiedades biológicas de las glicoproteínas, incluyendo su solubilidad, estabilidad frente a proteasas y a temperaturas elevadas, antigenicidad, inmunogenicidad, actividad biológica, farmacocinética y vida media en plasma. Por lo tanto, la glicosilación no solo modifica las características fisicoquímicas y bioquímicas de estas proteínas, sino que también afecta directamente su eficacia terapéutica (39).

5.4.1. Efectos sobre la estabilidad de las proteínas

Las proteínas terapéuticas presentan numerosos grupos funcionales que las hacen susceptibles a procesos de degradación química y física, como oxidación, desamidación, hidrólisis, fragmentación, desnaturalización y agregación. La glicosilación cumple un rol protector frente a estos mecanismos mediante el impedimento estérico, la estabilización de interacciones no covalentes, la protección contra el daño oxidativo y la reducción de la agregación no deseada. También contribuye a la estabilidad conformacional frente a variaciones de pH, temperatura y condiciones químicas, aumentando la solubilidad y disminuyendo la exposición de residuos hidrofóbicos. Estos efectos, en conjunto, favorecen una mayor estabilidad estructural, funcional y terapéutica de las glicoproteínas, tanto durante su almacenamiento como en condiciones fisiológicas (39–41).

5.4.2. Efectos sobre la farmacocinética y *clearance in vivo*

La glicosilación de proteínas terapéuticas ha demostrado mejorar su eficacia terapéutica al incrementar su biodisponibilidad *in vivo*, los niveles circulantes y la duración de los efectos, mediante la modulación de sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas. Entre los parámetros farmacocinéticos que pueden verse alterados por la glicosilación se incluyen: una absorción modulada en proteínas de mayor tamaño, una distribución más eficiente, una mayor vida media en circulación y una menor tasa de depuración (*clearance*). La glicosilación actúa a través de múltiples mecanismos para reducir el *clearance* de las proteínas terapéuticas (42,43).

La eficiencia de filtración renal aumenta rápidamente cuando el tamaño de las proteínas desciende por debajo de aproximadamente 40 kDa. En este contexto, los glicanos de gran tamaño resultan particularmente eficaces para evitar la filtración glomerular, ya que, a diferencia de las cadenas de aminoácidos que se pliegan formando estructuras compactas, los glicanos se encuentran completamente extendidos en el medio acuoso fisiológico y presentan una gran movilidad, lo que aumenta el radio hidrodinámico de las glicoproteínas, dificultando su eliminación renal (43). Además, la filtración renal puede verse inhibida por mecanismos de repulsión de cargas, dado que la barrera glomerular posee carga negativa debido a la presencia de glicosaminoglicanos. Así, los glicanos pueden prolongar significativamente la vida media plasmática mediante el aumento de la carga superficial, aportada principalmente por residuos de ácido siálico (44,45).

Un mecanismo más general relacionado con la depuración de glicoproteínas implica la captación celular mediada por receptores de lectina. El ejemplo más representativo de este tipo de mecanismo es la depuración hepática de proteínas en circulación a través del receptor de asialoglicoproteínas (ASGPR, *asialoglycoprotein receptor*) (46). Este receptor actúa mediante el reconocimiento multivalente de residuos terminales de galactosa presentes en N-glicanos no sialilados, eliminando rápidamente las proteínas diana de la circulación. Este proceso constituye un mecanismo natural de eliminación de proteínas "envejecidas", que con el tiempo pierden sus residuos terminales de ácido siálico. En este contexto, una alta ocupación de los sitios de glicosilación con ácido siálico resulta fundamental para prolongar la vida media en circulación de las proteínas terapéuticas (43). Por otra parte, la presencia de residuos terminales de N-acetilgalactosamina-4-sulfato o de oligosacáridos que contienen manosa o GalNac también se asocia con una mayor depuración, ya que estas estructuras son reconocidas por receptores específicos ubicados en células endoteliales hepáticas y células de Kupffer (47,48).

5.4.3. Efectos sobre la actividad biológica *in vitro* e *in vivo*

El efecto preciso de los glicanos sobre la bioactividad de las proteínas no puede generalizarse ni predecirse fácilmente. En muchos casos, un aumento en la sialilación o la incorporación de nuevos glicanos mejora las propiedades farmacocinéticas o farmacodinámicas de las proteínas terapéuticas. Sin embargo, en otros casos, una glicosilación reducida puede resultar beneficiosa. Un ejemplo claro de ello es la hormona folículo-estimulante (FSH), que es producida por la hipófisis anterior y actúa sobre las células gonadales tras unirse a los receptores específicos (FSHR), promoviendo el desarrollo folicular en mujeres y la espermatogénesis en hombres (49,50). Como se describirá con mayor detalle en la sección 9, la FSH endógena está compuesta por dos subunidades, alfa y beta, ambas con dos potenciales sitios de N-glicosilación. Se ha observado que la FSH hipoglicosilada puede ser entre 9 y 26 veces más activa *in vitro* que su variante completamente glicosilada; sin embargo, presenta una vida media en circulación significativamente más corta, atribuible probablemente a la pérdida de residuos de ácido siálico. De hecho, se ha demostrado que las isoformas de FSH con mayor contenido de ácido siálico poseen una mayor actividad biológica *in vivo*, probablemente debido a su menor depuración plasmática por el hígado y riñones. En consecuencia, para lograr una persistencia circulatoria óptima y, una mayor bioactividad, es importante no solo que los cuatro sitios de glicosilación estén ocupados, sino también que todas las cadenas de glicanos se encuentren protegidas mediante el agregado de ácido siálico terminal (50–52).

5.4.4. Efectos sobre la antigenicidad e inmunogenicidad

La glicosilación contribuye a las propiedades antigénicas de las proteínas de diversas maneras, ya sea inactivando el epítipo peptídico mediante el enmascaramiento de sitios antigénicos, o bien formando parte de la estructura reconocida por el anticuerpo. Algunas cadenas de oligosacáridos pueden ser antigénicas por sí solas y generar anticuerpos anti-carbohidratos, mientras que otras requieren del entorno proteico para ser reconocidas (53,54).

6. Glicoingeniería

La baja actividad o el rápido *clearance* plasmático representan desventajas frecuentes en muchas proteínas y péptidos terapéuticos. Entre las estrategias empleadas para aumentar su actividad o reducir su eliminación del organismo se incluyen la pegilación (55), la construcción de proteínas diméricas (56–58), o la fusión con elementos peptídicos diseñados para disminuir el *clearance* (59–62). Estos enfoques han mostrado distintos grados de éxito, aunque su aplicación ha sido limitada

debido a la pérdida de estructura o actividad, baja eficacia, dificultades en la producción o generación de anticuerpos neutralizantes (63–65). Una alternativa para incrementar la actividad *in vivo* y prolongar la duración del efecto terapéutico consiste en modificar los glicanos asociados a las proteínas mediante estrategias de glicoingeniería (29). Controlar la glicosilación constituye uno de los principales desafíos en la producción biotecnológica de proteínas, ya que, como se mencionó previamente, la misma puede afectar la eficacia, la vida media en suero o la antigenicidad de proteínas recombinantes (66). Además, como también se describió anteriormente, esta modificación postraduccional está influenciada por numerosos factores, incluyendo las condiciones del cultivo celular (67,68), los niveles de expresión de glicosiltransferasas en el hospedador (69), mutaciones genéticas (70), así como la estructura secundaria y terciaria de la proteína en torno al sitio de glicosilación (71).

La glicoingeniería puede aplicarse tanto directamente sobre la glicoproteína como sobre la línea celular utilizada para su producción (29).

6.1. Glicoingeniería celular

La ingeniería de líneas celulares constituye una de las estrategias de glicoingeniería más intensamente desarrollada en los últimos años, orientada a modificar las rutas de glicosilación con el propósito de obtener productos finales con propiedades mejoradas (72–74). Esta aproximación ha sido utilizada tanto para optimizar las características de las glicoproteínas producidas en células mamíferas, como para modificar los mecanismos de glicosilación en células no mamíferas, con el fin de habilitarlas para la producción de glicoproteínas terapéuticas.

6.1.1. Ingeniería de células de mamíferos

La glicoingeniería de células de mamíferos se ha centrado en modificar sus rutas de glicosilación para obtener glicoproteínas más homogéneas y similares a las humanas, además de mejorar su eficacia terapéutica. Se han explorado diferentes estrategias, entre ellas:

- La mutagénesis mediante eliminación génica (*knock-out*), que consiste en inactivar genes específicos involucrados en las rutas de glicosilación. Uno de los principales objetivos ha sido el gen *fut8*, que codifica la enzima fucosiltransferasa, responsable de la incorporación de fucosa en posición α 1,6 en el *core* del glicano. La eliminación exitosa de *fut8* ha permitido el desarrollo de una línea celular CHO *knock-out* capaz de producir anticuerpos monoclonales completamente defucosilados, los cuales exhiben una mayor actividad citotóxica

celular dependiente de anticuerpos (ADCC, *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*) y logran eficacia terapéutica a dosis reducidas (29).

- El empleo de ARN de interferencia, que se basa en el uso de pequeñas moléculas de ARN específicas para bloquear la expresión de enzimas clave dentro de la vía biosintética de los glicanos. Un ejemplo es el *knockdown* dirigido contra la enzima que cataliza la conversión del ácido N-acetilneuramínico (NeuAc) en ácido N-glicolilneuramínico (NeuGc), una modificación postraducciona indeseable en humanos por su potencial inmunogenicidad (29).
- La sobreexpresión de enzimas específicas involucradas en el procesamiento de glicanos, con el fin de modificar el perfil de glicosilación de proteínas recombinantes. Por ejemplo, la sobreexpresión combinada de las enzimas α 2,3-sialiltransferasa y β 1,4-galactosiltransferasa, o la sobreexpresión de α 2,3-sialiltransferasa y/o α 2,6-sialiltransferasa en células hospedadoras conduce a un aumento en los niveles de sialilación terminal de las cadenas de N-glicanos, prolongando la persistencia circulatoria y mejorando la eficacia *in vivo* de las proteínas terapéuticas (29).

6.1.2. Ingeniería de células no mamíferas

Las células no mamíferas presentan varias ventajas frente a las células mamíferas, como una mayor facilidad de cultivo, mayor rendimiento y menores costos de producción. Sin embargo, su aplicación en la producción de biofármacos se encuentra limitada por su capacidad restringida para llevar a cabo glicosilaciones complejas y por la incorporación de residuos potencialmente inmunogénicos. En este contexto, la glicoingeniería surge como una tecnología prometedora para superar estas limitaciones, ya que permite "humanizar" las glicoproteínas producidas en sistemas no mamíferos. Esta humanización se ha logrado utilizando las mismas estrategias descritas para células mamíferas, aunque dirigidas a blancos diferentes. En primer lugar, en las células no mamíferas se busca eliminar la producción de glicanos no humanos, como aquellos hipermanosilados o que contienen estructuras inmunogénicas. Una vez alcanzado este objetivo, es posible introducir en las células no mamíferas las enzimas necesarias para el procesamiento de glicanos de tipo mamífero, lo que permite construir una vía biosintética completamente humanizada y obtener glicoproteínas con perfiles de glicosilación compatibles con su uso terapéutico en humanos.

6.2. Glicoingeniería de proteínas

Las tecnologías de glicoingeniería también han sido utilizadas para modificar directamente las estructuras glicosídicas de las proteínas, lo cual puede lograrse mediante diferentes estrategias:

- Glicosilación quimioselectiva y sitio-específica de proteínas. En este enfoque, se busca insertar glicanos específicos en sitios de glicosilación previamente identificados como críticos para la actividad biológica. Para ello, se introducen etiquetas específicas en estos sitios mediante mutagénesis dirigida. Posteriormente, estas etiquetas reaccionan selectivamente con glicanos modificados que contienen grupos funcionales adecuados, a través de ligaciones quimioselectivas bioortogonales (29). Como se pueden introducir distintas etiquetas en diferentes sitios de una misma proteína, es posible incorporar múltiples glicanos distintos mediante ligaciones ortogonales, permitiendo así un control preciso sobre la estructura y mejorando la eficacia biológica de la glicoproteína (29).
- Reestructuración glicoenzimática de glicanos, que puede llevarse a cabo mediante dos estrategias. En una de ellas, las glicoproteínas producidas por las células hospedadoras son tratadas con enzimas para eliminar sus glicanos hasta dejar solo la unidad de GlcNAc más interna, generando proteínas con estructuras GlcNAc homogéneas. Luego, estas estructuras pueden extenderse en forma controlada utilizando enzimas seleccionadas, para obtener glicoproteínas maduras con glicanos definidos. No obstante, esta estrategia basada en extensiones secuenciales no garantiza una homogeneidad completa de glicoformas. Una alternativa consiste en la transferencia *en bloque* de un glicano grande previamente sintetizado a la proteína en un solo paso, catalizada por una endo- β -N-acetilglucosaminidasa (ENGase) natural o mutante (29).
- Incorporación de sitios adicionales de glicosilación en posiciones específicas de la cadena polipeptídica mediante mutagénesis dirigida. Esta estrategia ha sido utilizada para generar glicoproteínas con niveles aumentados de glicosilación y, por ende, de sialilación, lo que se traduce en una mayor vida media en suero y mejor actividad *in vivo* (29). Mediante esta estrategia pueden incorporarse nuevos sitios potenciales de N- y O-glicosilación a las proteínas.

6.2.1. N-glicoingeniería de proteínas

El desarrollo de la N-glicoingeniería de proteínas se basa en la selección racional de posiciones adecuadas para incorporar residuos N-glicosídicos, de forma tal que se

conserven la funcionalidad y las propiedades estructurales de la proteína de interés. El sistema natural de N-glicosilación reconoce una secuencia consenso (Asn–X–Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina). Sin embargo, en la práctica, esta secuencia consenso es una condición necesaria pero no suficiente para que ocurra la N-glicosilación.

Los procedimientos para incorporar nuevos N-glicanos a proteínas se basan en la modificación de su estructura primaria mediante dos estrategias principales:

- Introducción de mutaciones puntuales que originan nuevos sitios susceptibles de N-glicosilación, aprovechando regiones de la proteína que presentan características estructurales compatibles con la incorporación de glicanos. Esta estrategia consiste en sustituir aminoácidos específicos para generar la secuencia consenso Asn–X–Ser/Thr. Para el diseño de estos nuevos sitios de glicosilación, se debe evaluar cada triplete de aminoácidos en la secuencia de la proteína, identificando así posibles sitios que puedan modificarse mediante una o dos sustituciones puntuales para generar una secuencia consenso funcional. Idealmente, estos cambios deben ser mínimos (preferentemente una única mutación) para maximizar la probabilidad de que la proteína conserve su actividad biológica. Una vez identificados los sitios potenciales, se puede realizar una evaluación *in silico* adicional que permita priorizar variantes glicosiladas específicas para su validación experimental. En este análisis, se deben considerar dos criterios estructurales clave: (i) que el nuevo sitio de glicosilación esté expuesto al solvente y no oculto en el interior de la proteína, y (ii) que la posición del glicano no interfiera estéricamente con dominios funcionales importantes. Por ejemplo, en proteínas terapéuticas con actividad enzimática, el glicano no debe obstruir el acceso del sustrato al sitio activo (43). Esta metodología ha sido aplicada exitosamente a numerosas proteínas tales como eritropoyetina humana (hEPO) (75–77), interferón- α humano (hIFN- α) (78) e interferón- β humano (hIFN- β) (79,80).
- Fusión a péptidos que contienen sitios potenciales de N-glicosilación. En esta estrategia, la incorporación de nuevos sitios de N-glicosilación no se realiza mediante mutaciones puntuales sobre la secuencia natural de la proteína de interés, sino a través de la fusión de una secuencia peptídica que contiene sitios potenciales de glicosilación de tipo N. Estas secuencias pueden ser generadas *de novo* o derivadas de glicoproteínas conocidas, y se integran típicamente en el extremo N de la proteína. Esta elección se basa en que el extremo C presenta, en general, una menor propensión a la N-glicosilación. Este enfoque presenta

como principal ventaja el hecho de que permite introducir múltiples sitios de glicosilación mediante un único evento de modificación estructural: la elongación del extremo N. Esto reduce el riesgo de afectar la conformación tridimensional de la proteína central, preservando así su funcionalidad. No obstante, una limitación importante de esta estrategia es que, si el extremo N de la proteína participa directamente en la unión a su receptor o en interacciones funcionales críticas, la adición de un péptido portador de glicanos, estructuralmente voluminoso, puede interferir significativamente con su actividad biológica (81). Como ejemplos del empleo de esta metodología se puede mencionar la fusión de péptidos al hIFN- α (82) y a la FSH (83–85).

6.2.2. O-glicoingeniería de proteínas

La ausencia de una secuencia consenso definida para la O-glicosilación, junto con las características estructurales o del entorno que favorecen esta modificación, han orientado el desarrollo de estrategias de O-glicoingeniería basadas en la identificación de dominios peptídicos provenientes de proteínas naturales que presentan una alta densidad de O-glicanos, o bien en el diseño *de novo* de secuencias con alto potencial de O-glicosilación. Una estrategia ampliamente utilizada consiste en la fusión de péptidos que contienen múltiples sitios potenciales de O-glicosilación en los extremos N y/o C de las proteínas blanco. Esta modalidad de hiperglicosilación permite evitar modificaciones extensas en la estructura primaria de la proteína, reduciendo así el riesgo de generar alteraciones en niveles superiores de organización estructural (86).

Uno de los péptidos más empleados con fines de hiperglicosilación es el denominado CTP (*carboxyl-terminal peptide*), derivado del extremo C de la subunidad β de la gonadotropina coriónica humana (hCG) (87). Este péptido se caracteriza por contener cuatro residuos de serina que sirven como sitios para la incorporación de O-glicanos (88). La fusión del CTP ha sido aplicada exitosamente a diversas proteínas, entre ellas: la FSH de diversas especies (89–92), la hormona estimulante de tiroides humana (hTSH) (93), la subunidad α de la hCG (59), la hormona de crecimiento humana (hGH) (94), la hEPO (95,96) y el hIFN- α (86).

Por otra parte, en nuestro laboratorio se han desarrollado dos nuevos péptidos, denominados GMOP (*GM-CSF O-glycosylated peptide*) y mGMOP (*modified GMOP*), que derivan del Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos humano (hGM-CSF), una glicoproteína que posee dos sitios potenciales de N-glicosilación (N27 y N37) y cuatro de O-glicosilación (S5, S7, S9 y T10), estos últimos concentrados en el extremo N de la proteína. Estas glicosilaciones contribuyen a la estabilidad del hGM-CSF y, por lo tanto, prolongan su tiempo de vida media en circulación. Además, la

O-glicosilación favorece el enmascaramiento de sitios de reconocimiento inmunológico, disminuyendo la inmunogenicidad. Sobre esta base, y teniendo en cuenta la elevada densidad de O-glicanos en los primeros 10 aminoácidos del hGM-CSF, se diseñaron dos etiquetas peptídicas. El péptido GMOP (APARSPSPSTQPWE) corresponde directamente a la secuencia natural del extremo N del hGM-CSF, posee una longitud de 14 aminoácidos e incluye los 4 sitios potenciales de O-glicosilación, que se encuentran parcial o totalmente ocupados en la proteína nativa. La segunda etiqueta, mGMOP (APARSPSPTPTPTPT), fue diseñada *in silico* a partir del péptido GMOP con el objetivo de incrementar la probabilidad de O-glicosilación. Está compuesta por 15 aminoácidos: los 7 primeros coinciden con el extremo N del hGM-CSF y los 8 residuos adicionales incluyen 4 repeticiones de Pro y Thr, lo que permite generar un total de 6 sitios potenciales de O-glicosilación (97). La fusión de una (97) o hasta cuatro copias del mGMOP (98) al hIFN- α permitió incrementar tanto su masa molecular como su carga neta negativa, lo cual se tradujo en un aumento de su vida media plasmática. Además, se observó una mejora significativa en su estabilidad térmica y en su resistencia a la degradación por proteasas plasmáticas. Asimismo, estos estudios demostraron que las variantes portadoras de mGMOP presentaron mayor masa molecular e isoformas más ácidas en comparación con las fusionadas a GMOP, lo que refleja un número superior de sitios de O-glicosilación ocupados en la versión modificada del péptido. En conjunto, estos resultados indican que la fusión de múltiples copias del péptido mGMOP en los extremos del hIFN- α constituye una estrategia de glicoingeniería prometedora para mejorar las propiedades farmacocinéticas de proteínas terapéuticas con corta vida media. En particular, en condiciones de hiper-O-glicosilación definidas por el número de copias, mGMOP podría ser más eficiente que GMOP para prolongar la vida media plasmática, al favorecer una mayor incorporación de ácido siálico y, con ello, reducir la depuración plasmática.

7. Ganadería y terapias hormonales

La ganadería constituye una de las actividades económicas más relevantes y rentables tanto en nuestro país como en la región. En este contexto, se destinan continuamente recursos a la evaluación e implementación de nuevas tecnologías orientadas a incrementar su productividad, la cual está directamente relacionada con la eficiencia reproductiva y la calidad genética del ganado. Entre las metodologías más utilizadas actualmente se destacan las terapias hormonales dirigidas a estimular el desarrollo folicular y la ovulación. Estas permiten sincronizar los celos de los animales para que sean receptivos en el momento adecuado, mejorando así las tasas de concepción, ya sea en servicios naturales como en programas de inseminación artificial

(IA). Asimismo, es posible inducir la superovulación en hembras con características genéticas deseables y utilizar sus ovocitos, previa inseminación, en protocolos de transferencia de embriones. De este modo, un número reducido de hembras donantes de alta calidad genética puede generar una mayor cantidad de descendientes en un corto período de tiempo, mientras que hembras de menor valor genético pueden ser aprovechadas como receptoras (99–101).

8. Familia de hormonas glicoproteicas

La familia de hormonas glicoproteicas comprende a la FSH, también llamada folitropina, que participa en la estimulación de la gametogénesis en el macho y en el crecimiento de los folículos ováricos en la hembra, y la hormona luteinizante (LH), también llamada lutropina, cuya función es estimular la esteroidogénesis e inducir la ovulación y la luteinización en la hembra. Estas hormonas se sintetizan en las mismas células hipofisarias, situadas principalmente en la adenohipófisis (o hipófisis anterior). En diferentes células de la misma área, se sintetiza otro miembro de la familia, la TSH o tirotropina, que estimula a la glándula tiroides a sintetizar y segregar las hormonas tiroideas. También se incluye otra hormona que se puede ser purificada a partir de la placenta de primates y equinos, la gonadotrofina coriónica (CG), que tiene un rol importante durante las primeras etapas de la preñez, contribuyendo al mantenimiento del cuerpo lúteo (102).

Con excepción de la TSH, las restantes hormonas son conocidas de forma genérica con el nombre de gonadotrofinas, ya que estimulan el desarrollo y función de las gónadas y, en función del sitio donde son producidas, se las clasifica como gonadotrofinas pituitarias (LH y FSH) y gonadotrofina placentaria (CG). Estas hormonas, con sus diversas funciones fisiológicas, están estrechamente relacionadas en su estructura y son las hormonas proteicas más complejas reconocidas hasta la fecha. Cada una consta de dos cadenas o subunidades peptídicas, designadas α y β , que se encuentran glicosiladas en residuos específicos y poseen varios enlaces disulfuro internos. Estas hormonas se encuentran en todos los mamíferos estudiados, y también se han observado hormonas con propiedades similares en los vertebrados inferiores (87). Todos los mamíferos expresan la TSH y las dos gonadotrofinas pituitarias; en contraste, la CG es expresada únicamente por primates y equinos (103). Dentro de una misma especie, la subunidad α es común a todos los miembros de la familia y se encuentra codificada por un único gen, mientras que diferentes genes codifican las subunidades β , que confieren especificidad a los heterodímeros (104).

9. Hormona folículo-estimulante

Al igual que los otros miembros de la familia de hormonas glicoproteicas, la FSH es un heterodímero compuesto por dos subunidades, α y β , unidas mediante interacciones no covalentes. En mamíferos no humanos, las subunidades α de las hormonas glicoproteicas están compuestas por 96 aminoácidos y presentan dos sitios de N-glicosilación localizados en los residuos Asn56 y Asn82 (105). Por su parte, las subunidades β de la hormona folículo-estimulante (FSH β) de todas las especies de mamíferos están formadas por 111 aminoácidos y contienen dos sitios de N-glicosilación en Asn7 y Asn24, no encontrándose sitios para la unión de glúcidos de tipo O- en ninguna de las subunidades (106,107).

A pesar de que las estructuras tridimensionales para las hormonas glicoproteicas bovinas no han sido resueltas hasta la fecha, se ha logrado cristalizar y analizar mediante difracción de rayos X algunas de las contrapartes humanas (106,108,109). De acuerdo con Fox y col. (106), las subunidades α y β de la hFSH se encuentran estructuradas de manera similar entre ellas y de forma idéntica a la hCG. La hFSH α se encuentra estabilizada por 5 puentes disulfuro entre los residuos Cys7-31, Cys10-60, Cys28-82, Cys32-84 y Cys59-87. Los últimos puentes entre los residuos Cys10-60, Cys28-82 y Cys32-84 comprenden un motivo estructural conocido como “nudo de cistina” (*cystine knot*). La hFSH β presenta 6 puentes disulfuro entre los residuos Cys3-51, Cys17-66, Cys20-104, Cys28-82, Cys32-84 y Cys87-94. El nudo de cistina en esta subunidad se encuentra formado por los puentes entre los residuos Cys3-51, Cys28-82 y Cys32-84. El nudo de cistina presente en ambas subunidades provoca que las cadenas polipeptídicas se plieguen formando un lazo o *loop* largo (α L2 y β L2) que se ubica de manera opuesta a dos *loops* adicionales que adoptan una forma de horquilla (α L1, α L3 y β L1, β L3). La subunidad β forma otra estructura única denominada *seatbelt* (cinturón) entre los residuos 84-104. Esta región se desvía del nudo central como resultado de la presencia de un puente disulfuro (Cys 87-94), para luego unirse al primer lazo de la horquilla (β L1) mediante el puente disulfuro (Cys20-104). El ensamblaje se realiza enroscando la hebra de la subunidad β que comprende el *seatbelt* alrededor del segundo loop de la hFSH α (α L2). La formación final del puente disulfuro entre los residuos Cys20-104 bloquea el *seatbelt* y asegura el dímero $\alpha\beta$, evitando su disociación (Figura 7). Como resultado, las dos subunidades están íntimamente asociadas mediante contactos intermoleculares que ocultan aproximadamente el 32% de la superficie accesible al solvente de los monómeros (106).

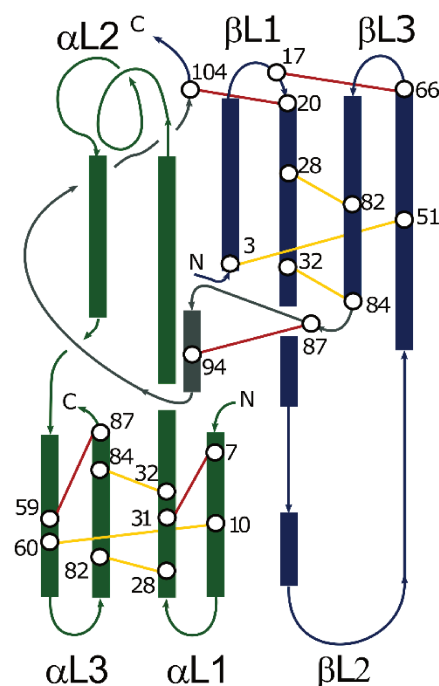


Figura 7. Representación esquemática de la estructura del dímero de hFSH. La subunidad α se muestra en verde y la subunidad β en azul; la porción correspondiente al *seatbelt* de la última se muestra en gris. Las barras sólidas gruesas representan hebras β . La ubicación de las cisteínas involucradas en los puentes disulfuro (líneas rojas) se muestran mediante círculos. Las líneas amarillas en ambas subunidades representan los puentes disulfuro involucrados en la estructura de nudo de cistina. N, extremo N; C, extremo C. Figura adaptada de Ruddon y col., 1996 (110).

9.1. Glicosilación

Las hormonas glicoproteicas son altamente heterogéneas; esta heterogeneidad se origina principalmente en su composición proteína-carbohidrato y en la complejidad estructural de los glicanos unidos al esqueleto proteico (111). En particular, se ha demostrado que la FSH hipofisaria se secreta a la circulación como una mezcla de formas glicosiladas que difieren en el número de sitios de N-glicosilación ocupados (112,113). Las formas glicosiladas pueden clasificarse en isoformas o glicoformas. Las isoformas son variantes con diferente carga neta, generalmente detectadas mediante técnicas de separación basadas en la carga. Las glicoformas, en cambio, presentan diferencias estructurales, ya sea por la complejidad de las ramificaciones glicosídicas o por la presencia o ausencia de glicosilación en cada sitio potencial de N-glicosilación. Por lo tanto, la heterogeneidad de las gonadotrofinas puede dividirse en dos tipos:

- **Macroheterogeneidad**, que en el caso de la FSH resulta de la ausencia de una o ambas cadenas de oligosacáridos en la subunidad β . Se han reportado cuatro variantes de la subunidad β (FSH β): una FSH β de 24 kDa, que posee glicanos en ambos sitios de N-glicosilación (Asn7 y Asn24); una FSH β de 21 kDa, que presenta glicanos únicamente en Asn7; una variante de 18 kDa, que posee

glicanos solamente en Asn24; y una variante de 15 kDa, que carece de glicanos en ambos sitios potenciales de N-glicosilación (49–52,114–116).

- **Microheterogeneidad**, que proviene de la variación en la estructura y complejidad de los glicanos unidos a la hormona. Los glicanos unidos a la FSH son del tipo complejo, con estructuras bi-, tri- y tetra-antennarias, las cuales se encuentran comúnmente sialiladas en diferentes grados (117).

La glicosilación de la FSH es un proceso clave que determina tanto su perfil farmacocinético como sus efectos biológicos, ya sea en estudios *in vivo* como *in vitro* (118). En particular, el grado de glicosilación y el nivel de sialilación influyen de forma directa sobre su comportamiento en el organismo. Se ha demostrado que las isoformas de FSH hipofisaria humana altamente sialiladas presentan una mayor permanencia en circulación en modelos murinos. En cambio, cuando los residuos de galactosa no están cubiertos por ácido siálico, son reconocidos por el ASGPR, lo que resulta en una depuración más rápida del torrente sanguíneo (118–120).

9.2. Interacción con el receptor

El evento inicial en la acción de las hormonas glicoproteicas es su unión a receptores altamente específicos ubicados en la membrana de las células blanco. En particular, el receptor de FSH pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, caracterizados por presentar siete dominios transmembrana (121). Los receptores de hormonas glicoproteicas (GpHR, *glycoprotein hormone receptors*) están conformados por un extenso ectodominio N-terminal (ECD), estructurado en repeticiones ricas en leucina (LRR, *leucine-rich repeat*) responsables de la afinidad y selectividad hacia su hormona específica. Este ectodominio es seguido por siete hélices transmembrana y una α -hélice citoplasmática paralela a la membrana, característica de los receptores acoplados a proteína G (GPCR, *G protein-coupled receptors*), que cumplen un rol fundamental en la transducción de señales. El ECD adopta una curvatura en forma de herradura, típica de las LRR, en la cual se inserta la hormona (Figura 8) (122).

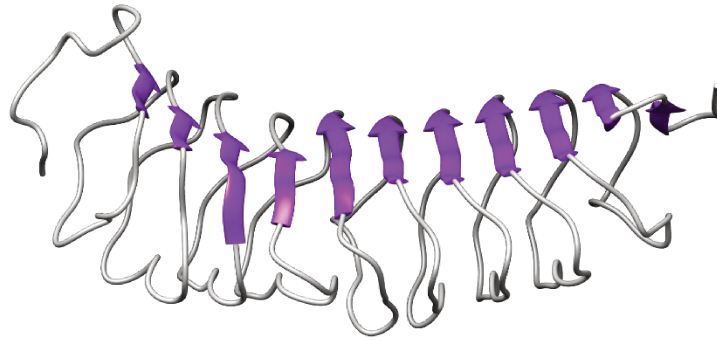


Figura 8. Representación en forma de cinta (*ribbon*) del ectodominio (ECD) de un receptor de hormonas glicoproteicas (GpHR).

La unión de la FSH a su receptor induce el acoplamiento de este a una proteína G heterotrimérica compuesta por las subunidades α , β y γ , permitiendo el reemplazo del GDP unido a la subunidad α por GTP. Este intercambio provoca un cambio conformacional que disocia la subunidad $G\alpha$ del complejo. La subunidad $G\alpha$ activada estimula la adenilato ciclasa en la membrana plasmática, catalizando la conversión de ATP en AMPc, lo que produce un incremento en los niveles intracelulares de este segundo mensajero. El aumento de AMPc activa la proteína quinasa A (PKA, *protein kinase A*), que fosforila y activa a las proteínas de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB, *cAMP response element-binding protein*), así como a otras proteínas efectoras, desencadenando la respuesta fisiológica correspondiente (Figura 9) (123).

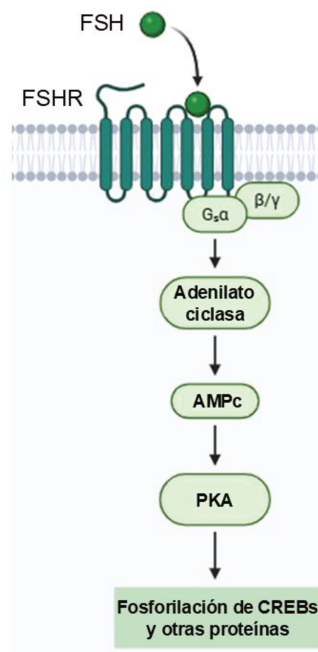


Figura 9. Representación esquemática de la vía de transducción de señales del receptor de la hormona FSH (FSHR).

9.3. bFSH en protocolos de superovulación

Las tecnologías de reproducción asistida (ARTs, *assisted reproductive technology*) han transformado las industrias de producción lechera y de carne bovina a nivel mundial, revolucionando el enfoque reproductivo y de selección genética, lo que ha derivado en mejoras significativas tanto en la calidad como en la cantidad de productos animales (124). En este contexto, los tratamientos hormonales desempeñan un papel clave en el control y manipulación de los procesos reproductivos, mejorando de manera sustancial la fertilidad del ganado.

La metodología conocida como superovulación y transferencia de embriones (MOET, *multiple ovulation embryo transfer*) ha sido aplicada durante más de 40 años en programas de mejora genética bovina, con resultados ampliamente positivos. Esta técnica consiste en estimular hormonalmente la superovulación de la hembra donante, seguida por su inseminación, con el fin de obtener el mayor número posible de embriones transferibles a hembras receptoras que llevarán adelante la gestación. La sincronización del ciclo estral entre donantes y receptoras es un paso crítico, ya que permite que ambas se encuentren en fases compatibles del ciclo reproductivo al momento de la transferencia, aumentando significativamente las tasas de éxito gestacional (125). En los protocolos MOET, la sincronización y superovulación se logran mediante la administración de hormonas gonadotróficas. Entre las más utilizadas se encuentran FSH, LH, hCG y la gonadotrofina coriónica equina (eCG), todas empleadas para inducir el desarrollo folicular, la ovulación y mejorar la fertilidad en bovinos (126–129). Aunque inicialmente se utilizaba eCG como tratamiento de referencia, actualmente la opción más común y efectiva involucra el uso de FSH de origen pituitario (pit-FSH). Esta presenta varias ventajas respecto a la eCG, como una menor incidencia de folículos no ovulatorios, reducción en la formación de quistes foliculares, una respuesta ovulatoria más predecible y una mayor cantidad y calidad de embriones transferibles (100,101).

No obstante, las preparaciones de FSH más utilizadas actualmente en reproducción bovina se obtienen mediante extracción y purificación a partir de glándulas pituitarias animales (principalmente porcinas y, en menor medida, ovinas). Debido a su origen, estas preparaciones presentan importantes desventajas en cuanto a su calidad, incluyendo:

- **Variabilidad en la bioactividad entre lotes**, atribuida a la heterogeneidad en las glicoformas de FSH (más de 20), lo cual repercute en la inconsistencia de los resultados obtenidos, especialmente en el número de embriones transferibles (101).

- **Contaminación con LH en proporciones variables y no controladas**, lo cual puede inducir una luteinización prematura si la exposición es temprana, reduciendo las tasas de fertilización y la calidad embrionaria (100).
- **Riesgos sanitarios asociados a contaminantes biológicos**, como virus o priones, lo que contradice las tendencias regulatorias actuales orientadas a mejorar la seguridad de los productos veterinarios (101).
- **Riesgo de inmunogenicidad**: el uso repetido de FSH heteróloga puede inducir una respuesta inmune humoral que disminuya la eficacia del tratamiento en exposiciones subsecuentes, al menos en algunas especies (100).

A esto se suma el hecho de que los tratamientos tradicionales de superovulación requieren múltiples aplicaciones intramusculares diarias (habitualmente dos por día) tanto para producción embrionaria *in vivo* (99) como *in vitro* (130). Esta necesidad se debe a la corta vida media de la FSH exógena. Estudios farmacocinéticos han estimado una vida media plasmática de aproximadamente 5 h y una desaparición completa entre las 10 y 12 h posteriores a la administración (101,131–133). Esto obliga a una manipulación precisa y frecuente durante el tratamiento, lo cual resulta poco práctico en programas de gran escala, donde la complejidad del manejo puede conducir a errores y a resultados reproductivos subóptimos.

9.4. Producción de bFSH recombinante

Actualmente, existe una demanda creciente por protocolos de superovulación simplificados, que sean eficientes y fácilmente aplicables en condiciones de campo, reduciendo la manipulación y disminuyendo la probabilidad de errores. En respuesta a esta necesidad, se han desarrollado diversas estrategias orientadas a prolongar la liberación de FSH, con el objetivo de mejorar la eficiencia del tratamiento, reducir la frecuencia de administración y aumentar las tasas de éxito de los protocolos de superovulación (124).

En este contexto, la tecnología de ADN recombinante ha surgido como un avance farmacológico significativo para la producción de FSH recombinante (rFSH). Si bien se ha reportado la obtención de rFSH en múltiples sistemas no mamíferos, como bacterias, levaduras, células vegetales, insectos y protozoos (92,134–143), en la actualidad los productos utilizados en protocolos comerciales aún derivan de fuentes animales. Un factor determinante en esta limitación es que la rFSH producida en sistemas no mamíferos no ha demostrado actividad biológica *in vivo*, o bien presenta una bioactividad reducida, probablemente como consecuencia de su rápida depuración en circulación debido a la ausencia de ácidos siálicos terminales (135,136,138–143). En

contraste, la rFSH producida en sistemas de expresión mamíferos ha demostrado una actividad biológica adecuada en modelos animales, como ratas o especies de destino (85,91,144–147), lo que resalta la importancia de un perfil de glicosilación apropiado para garantizar su eficacia. En particular, estudios recientes han mostrado resultados alentadores con el uso de FSH bovina (rbFSH) recombinante de acción prolongada. Esta formulación de larga duración, obtenida mediante estrategias de N- u O-glicoingeniería, ha demostrado potencial para reducir el número de aplicaciones requeridas y mejorar la eficiencia de los protocolos de superovulación tanto *in vivo* (85,147) como en la producción embrionaria *in vitro* (148,149).

Por todos los motivos expuestos, resulta razonable el desarrollo de un medicamento innovador que combine una mayor seguridad desde el punto de vista sanitario con una mayor vida media plasmática, lo que permitiría reducir el número de dosis necesarias y, en consecuencia, disminuir tanto los costos como los inconvenientes asociados a la administración repetida de la hormona. En este sentido, la producción de rbFSH en cultivos de células de mamífero constituye una alternativa atractiva frente al uso de fuentes animales que aún predominan en el mercado (extractos liofilizados obtenidos a partir de glándulas pituitarias porcinas), ofreciendo un producto veterinario recombinante con elevada consistencia y reproducibilidad entre lotes, libre de actividad LH y exento de contaminantes animales como virus o priones, garantizando así un perfil de seguridad superior.

Las células de mamífero poseen la capacidad de llevar a cabo modificaciones postraduccionales complejas, fundamentales para el correcto plegamiento, maduración y ensamblado de las dos subunidades de la FSH. Estas modificaciones, en particular las glicosilaciones, resultan críticas para determinar su vida media plasmática y, en consecuencia, su potencia biológica *in vivo*. En particular, la línea celular CHO-K1 se destaca como un huésped sumamente atractivo para la expresión de rbFSH, dado que expresa un amplio repertorio de glicosiltransferasas capaces de adicionar N-glicanos complejos del tipo bi-, tri- y tetra-sialilados, así como generar estructuras de O-glicanos de tipo mucina mono- y bi-sialiladas (150). Además, los bioprocesos basados en cultivos de células CHO en biorreactores bajo modo de perfusión han demostrado ser capaces de alcanzar altas densidades celulares y sostener una elevada productividad específica, lo cual se traduce en un aumento significativo de los niveles de proteína recombinante obtenidos. Este aspecto es de particular relevancia, dado que impacta de manera directa en la reducción de los costos asociados a la producción a escala industrial.

Finalmente, el desarrollo de un análogo de rbFSH de larga duración (rbFSH-LD), como alternativa a las formulaciones previamente reportadas, mediante una novedosa estrategia de glicoingeniería que involucra la incorporación de nuevos sitios de

O-glicosilación a través de su fusión a repetidas copias de la etiqueta mGMOP, representa una vía prometedora para prolongar su vida media plasmática y reducir la frecuencia de administración. Esto contribuiría tanto a la reducción de los costos como a la mejora en el manejo del ganado y la simplificación de los procedimientos productivos.

En este contexto, la hipótesis de este trabajo de tesis postula que, en conjunto, estas estrategias permitirían la generación de un producto biotecnológico innovador de gran utilidad en ganadería, destinado a incrementar la eficiencia de producción de crías de vacas de elevada calidad genética.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo de tesis consiste en establecer una plataforma biotecnológica basada en el cultivo de células de mamíferos para la producción de dos nuevos biológicos veterinarios: una hormona folículo-estimulante bovina recombinante (rbFSH) y una variante de larga duración (rbFSH-LD).

2. Objetivos específicos

Para llevar a cabo el objetivo general, se proponen los siguientes objetivos específicos:

- I. Diseñar una nueva variante recombinante de rbFSH de larga duración (rbFSH-LD) mediante la incorporación de tres copias secuenciales del péptido mGMOP en el extremo C de la subunidad β . Obtener las secuencias codificantes de las subunidades α , β y β -LD de la rbFSH.
- II. Desarrollar un proceso de producción de rbFSH y rbFSH-LD mediante la generación de líneas y clones recombinantes estables de células CHO-K1 y su cultivo a alta densidad en biorreactores utilizando medio de cultivo libre de suero fetal bovino.
- III. Optimizar procesos de purificación de las variantes rbFSH y rbFSH-LD a partir de los sobrenadantes de cultivo de las líneas y clones productores.
- IV. Desarrollar metodologías analíticas que permitan la detección, identificación y cuantificación de rbFSH y rbFSH-LD.
- V. Caracterizar la rbFSH y rbFSH-LD en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas, farmacocinética y actividad biológica *in vivo*. Comparar los resultados entre las mismas y con respecto a la FSH porcina obtenida a partir de glándula pituitaria (FSH comercial).

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos y soluciones

Todos los reactivos utilizados fueron de grado de pureza analítica y todas las soluciones acuosas fueron preparadas con agua ultrapura obtenida por ósmosis inversa, con una resistividad de 18,2 M Ω .cm y filtración (0,22 μ m) empleando un equipo Milli Q^{UF} (Millipore), excepto en los casos donde se aclara expresamente.

2. Diseño de las variantes recombinantes de bFSH

Las secuencias codificantes de las subunidades bFSH α (número de acceso P01217) y bFSH β (número de acceso P04837) se obtuvieron de la base de datos Uniprot. En cada construcción se incluyó el péptido señal natural de cada subunidad. Para el diseño de la variante de larga duración (rbFSH-LD), se insertaron 3 copias de la secuencia codificante de mGMOP a la región C-terminal de bFSH β para proporcionar sitios potenciales de O-glicosilación a la subunidad β . Para facilitar el procesamiento posterior, se incluyó una etiqueta 6xHis en el extremo C de cada construcción.

3. Vectores plasmídicos

A continuación, se describen los diferentes vectores plasmídicos utilizados para la generación de las distintas líneas celulares.

3.1. Vectores pUC57 rbFSH α y rbFSH β -LD

Estos vectores de clonado fueron provistos por la empresa Gene Universal. Ambos contienen:

- Un origen de replicación bacteriano (Col E1 ori), que permite la amplificación del plásmido en *E. coli*.
- Un gen de resistencia al antibiótico ampicilina (AmpR).

El vector pUC57 rbFSH α posee 3.055 pb (Figura 10) y contiene la secuencia codificante de rbFSH α de 384 pb, donde los primeros 72 pb codifican para el péptido señal natural de dicha subunidad.

El vector pUC57 rbFSH β -LD posee 3.229 pb (Figura 10), e incluye la secuencia codificante de rbFSH β -LD de 558 pb que comprende su péptido señal natural de 60 pb de longitud al inicio de dicha secuencia. La secuencia codificante de las 3 copias de mGMOP se encuentra flanqueada por sitios de corte de la enzima *NheI*, permitiendo la eliminación de dicha secuencia mediante digestión y religado del vector.

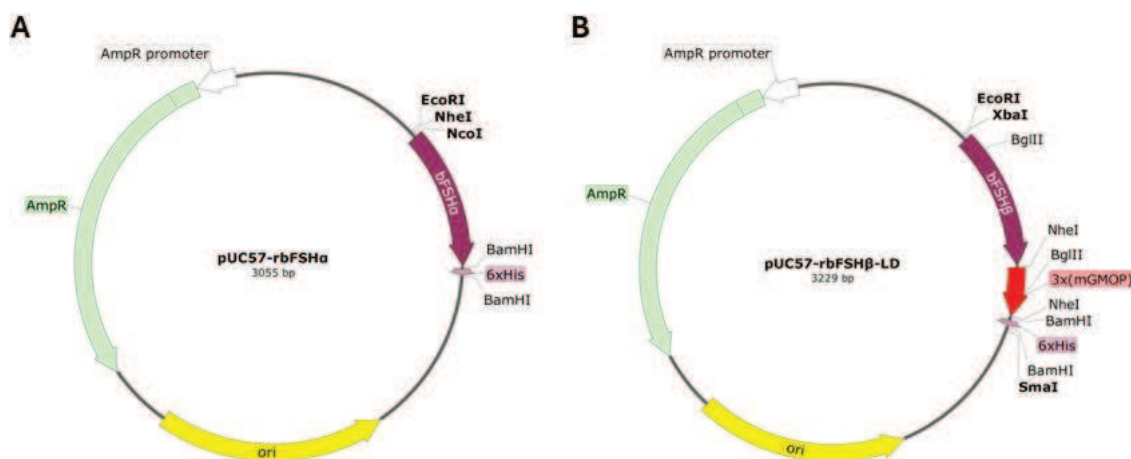


Figura 10. Representación esquemática de los vectores plasmídicos conteniendo las secuencias codificantes de las subunidades de rbFSH. (A) Vector pUC57-rbFSH α . (B) Vector pUC57-rbFSH β -LD.

3.2. Vector pLV-EF1 α

El vector de transferencia del sistema lentiviral fue obtenido con anterioridad en nuestro laboratorio (151). Posee 8.512 pb y contiene todos los elementos necesarios para la generación de los vectores lentivirales (Figura 11A).

3.3. Vector pLV-EF1 α -rbFSH α , pLV-EF1 α -rbFSH β y pLV-EF1 α -rbFSH β -LD

Los vectores pLV-EF1 α -rbFSH α y pLV-EF1 α -rbFSH β -LD se generaron mediante el clonado de las secuencias rbFSH α y rbFSH β -LD, provenientes de los plásmidos comerciales pUC57-rbFSH α -His y pUC57-rbFSH β -LD, respectivamente, en el vector pLV-EF1 α . El vector pLV-EF1 α -rbFSH β fue generado al eliminar, mediante digestión con endonucleasas de restricción y religado del vector, la secuencia codificante de las 3 copias de mGMOP del vector pLV-EF1 α -rbFSH β -LD. Estos vectores se muestran en la Figura 11.

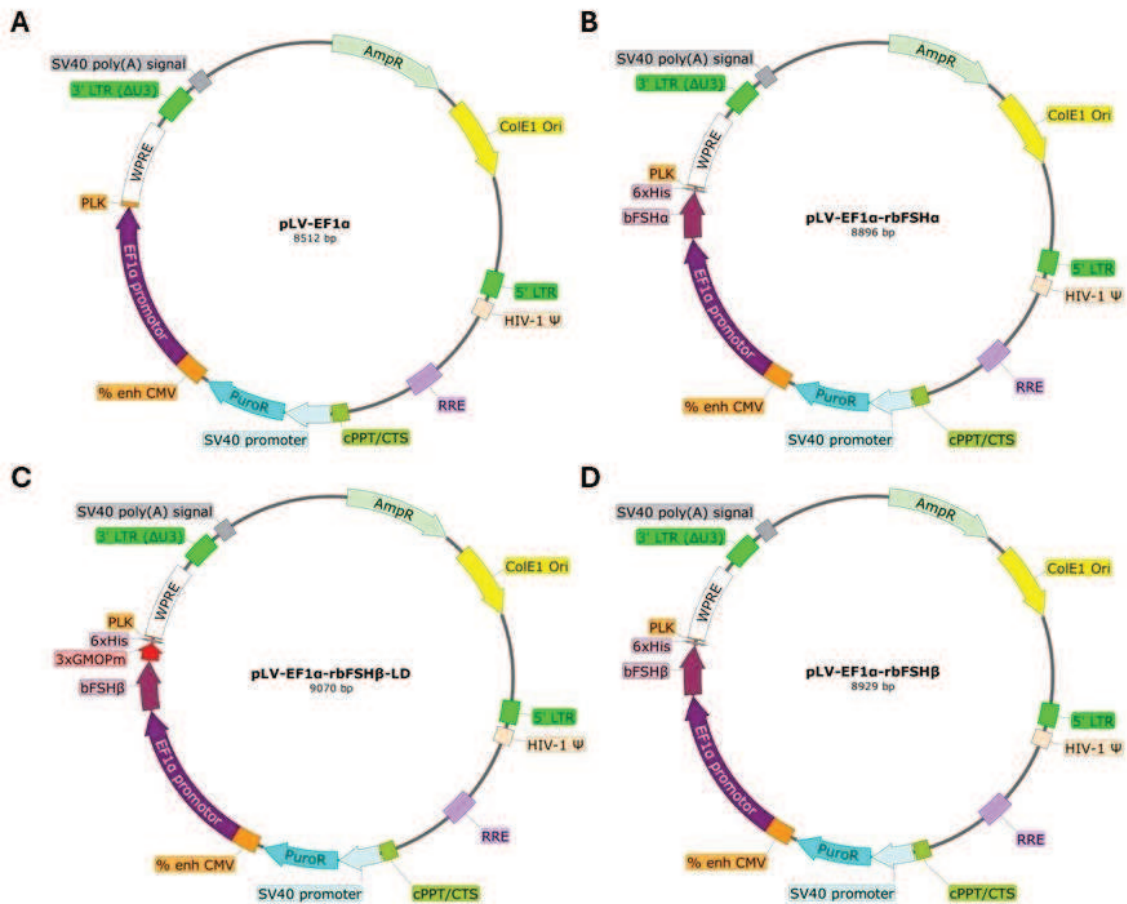


Figura 11. Representación esquemática de los vectores lentivirales de transferencia. (A) Vector pLV-EF1 α . **(B)** Vector pLV-EF1 α -rbFSH α . **(C)** Vector pLV-EF1 α -rbFSH β -LD. **(D)** Vector pLV-EF1 α -rbFSH β .

3.4. Vectores lentivirales empaquetadores

Los vectores empaquetadores (pMDLg/pRRE, pMD2.G y pRSVRev) del sistema lentiviral de tercera generación (152–154) se muestran en la Figura 12.

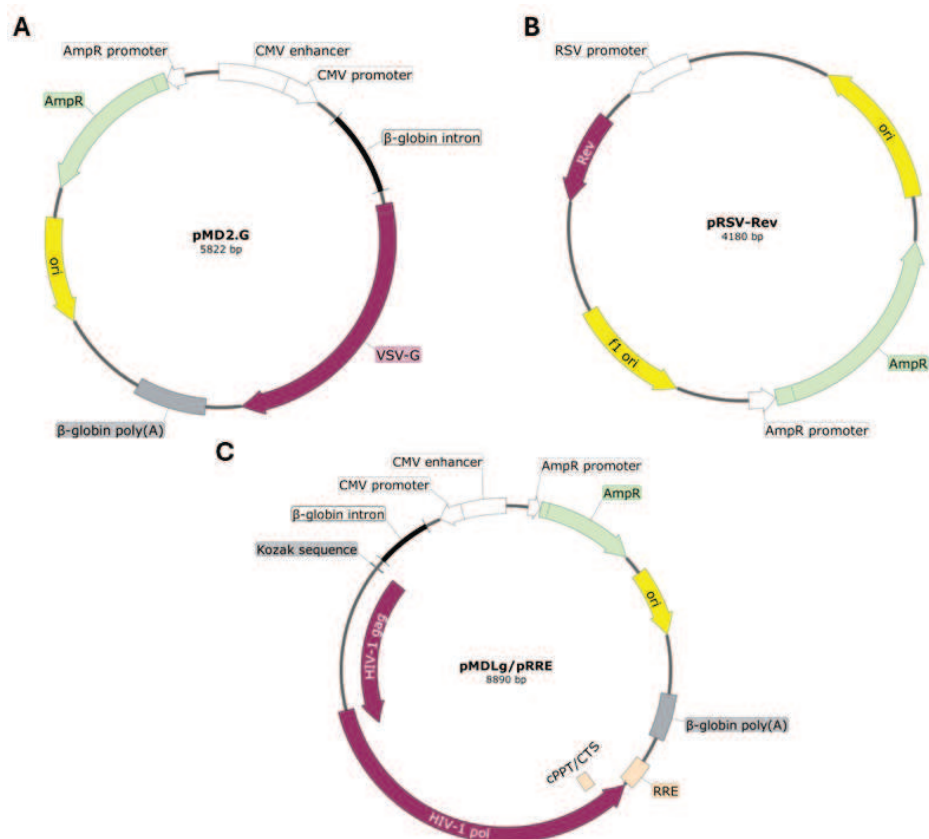


Figura 12. Representación esquemática de los vectores lentivirales empaquetadores. (A) Vector pMD2.G. **(B)** Vector pRSV-Rev. **(C)** Vector pMDLg/pRRE.

4. Técnicas de biología molecular

4.1. Líneas celulares procariotas

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

4.2. Medios de cultivo para células procariotas

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

Medio LB (Lysogeny Broth):

- Triptona 10 g.l⁻¹
- Extracto de levadura 5 g.l⁻¹
- NaCl 10 g.l⁻¹
- pH 7,2
- Antibiótico: ampicilina 100 µg.mL⁻¹

Agar LB:

- Medio LB
- Agar 2% (P/V)
- Antibiótico: ampicilina 100 µg.mL⁻¹

4.3. Purificación de ADN plasmídico

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

4.3.1. Minipreparación de ADN plasmídico

Las preparaciones de plásmidos a partir de células TOP 10 transformadas se realizaron según el protocolo de Birnboim y Doly (155). Se centrifugaron 1,5 mL de un cultivo saturado de células cultivadas en medio LB, a 5.000 x *g* durante 5 min. El *pellet* celular fue resuspendido en 100 µl de solución de miniprep I. Luego de 5 min de incubación a temperatura ambiente (TA) se agregaron 200 µl de solución de miniprep II, se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 5 min. Posteriormente, se agregaron 150 µL de acetato de potasio 5 M (pH 5,2) y se incubó nuevamente en hielo durante 15 min, se centrifugó a 12.000 x *g* durante 15 min a 4 °C y el sobrenadante (SN) se trató con 400 µL de una mezcla de fenol saturado en Tris-HCl (pH 8,0) y cloroformo (1:1) a fin de remover las proteínas de la muestra. Luego se centrifugó durante 5 min a 8.000 x *g* a TA y el ADN de la fase acuosa se precipitó durante 20 min a -70 °C con 0,6 vol. de isopropanol en medio acetato de sodio 0,3 M (pH 5,2). El ADN plasmídico se recuperó mediante centrifugación a 12.000 x *g* durante 15 min a 4 °C y se lavó con etanol 70% (V/V) para eliminar sales. Se centrifugó, se secó el precipitado y se resuspendió en 30 µL de agua Milli Q autoclavada.

Solución de miniprep I: glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 8,0

Solución de miniprep II: NaOH 0,2 M, SDS 0,1% (P/V)

4.3.2. Maxipreparación de ADN plasmídico

Con el fin de obtener cantidades suficientes de los vectores, se llevaron adelante preparaciones de ADN plasmídico en gran escala, tal como se describe a continuación:

Se inocularon 50 mL de medio de cultivo LB con una colonia proveniente de un cultivo en medio LB-Agar y se incubó a 37 °C a 180 rpm durante 16 h. Luego se centrifugó a 2500 x *g* durante 10 min a 4 °C, descartándose el SN. El *pellet* fue

resuspendido en 10 mL de solución I de maxiprep y se mantuvo en hielo durante 5 min. Posteriormente, se agregaron 20 mL de solución II de maxiprep y se homogeneizó suavemente para luego incubar en hielo 5 min. A continuación, se agregaron 5 mL de cloruro de calcio 6,6 M y 15 mL de acetato de potasio 5 M (pH 5,2), se homogeneizó nuevamente y se incubó en hielo por 10 min. Luego se centrifugó a $2.500 \times g$ por 30 min a 4°C y el SN fue filtrado con papel de filtro en tubos cónicos de 50 mL. Se realizó una precipitación con 0,6 vol. de isopropanol a -70°C por 20 min y luego se centrifugó a $2.500 \times g$ por 20 min a 4°C . El pellet obtenido fue resuspendido en 1 mL de agua Milli Q autoclavada y dividido en dos tubos eppendorf, donde se realizaron extracciones con fenol saturado en Tris-HCl (pH 8,0) y cloroformo (1:1) a fin de remover las proteínas de la muestra. Luego se centrifugó durante 5 min a $8.000 \times g$ a TA y el ADN de la fase acuosa se precipitó durante 20 min a -70°C con 0,6 vol. de isopropanol. Se centrifugó a $12.000 \times g$ por 20 min a 4°C y el *pellet* fue lavado con 300 μL de etanol 70% (V/V). Tras otra centrifugación a $12.000 \times g$ por 5 min a 4°C , el *pellet* obtenido fue secado en un bloque seco termostatzado a 37°C , hasta eliminar completamente el agua de la muestra. El pellet obtenido fue resuspendido en 500 μL de agua Milli Q autoclavada con 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de RNasa A e incubado por 60 min a 37°C en bloque seco, para eliminar restos de ARN. Se realizó una nueva extracción con fenol saturado en Tris-HCl (pH 8,0) y cloroformo (1:1), y la fase acuosa se precipitó durante 20 min a -70°C con 0,6 vol. de isopropanol en medio acetato de sodio 0,3 M (pH 5,2). Se centrifugó a $12.000 \times g$ por 20 min a 4°C y el *pellet* fue lavado nuevamente con 300 μL de etanol 70% (V/V). Tras otra centrifugación a $12.000 \times g$ por 5 min a 4°C , el *pellet* obtenido fue secado en un bloque seco termostatzado a 37°C , hasta la completa eliminación del agua de la muestra. Finalmente, el *pellet* fue resuspendido en 300 μL de agua Milli Q autoclavada y se determinó la concentración y pureza del ADN plasmídico obtenido.

Solución de maxiprep I: glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 8,0

Solución de maxiprep II: NaOH 0,2 M, SDS 0,1% (P/V)

4.4. Determinación de la concentración y pureza del ADN

Se determinó la absorbancia de las muestras a $\lambda = 260 \text{ nm}$ y $\lambda = 280 \text{ nm}$, en espectrofotómetro UV-visible (*NanoDrop Lite*, Thermo Fisher Scientific) y se calculó la concentración y pureza de los plásmidos, según las siguientes ecuaciones.

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

$$\text{Pureza de la muestra} = \frac{\text{DO}(260 \text{ nm})}{\text{DO}(280 \text{ nm})} \quad (2)$$

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

4.5. Digestiones enzimáticas

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

4.6. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Las separaciones de ADN en geles de agarosa se realizaron empleando el sistema submarino (156).

Para la preparación de los geles, se pesó 1 g de agarosa y se disolvió en 100 mL de *buffer* TAE en horno microondas hasta completa fundición. La solución se enfrió a 60 °C y se adicionó 10 µL de *SYBR® Safe DNA gel Stain* (Invitrogen). Esta solución se colocó en un soporte adecuado y se le introdujo un peine de 1 mm de espesor para formar los carriles de siembra, el cual se retiró una vez solidificado. El gel se colocó en una cuba electroforética y se cubrió completamente con *buffer* TAE.

Las muestras de ADN se mezclaron con *buffer* de siembra 10X y cuidadosamente se sembraron en cada una de las calles del gel. Se aplicó un voltaje de entre 80 y 100 V hasta observar una adecuada migración de los colorantes del *buffer* de siembra.

Finalmente, los geles fueron examinados utilizando un transiluminador *Safe Imager™* (Invitrogen) y fotografiados. Para estimar la longitud de los fragmentos de ADN separados se empleó el marcador de masa molecular *Trans 2K plus II Molecular Weight Marker* (TransGen Biotech).

Buffer TAE: Tris acetato 40 mM, Na₂EDTA 1mM, pH 8,0

Buffer de siembra 10X: Ficoll 400 10% (P/V), azul de bromofenol 0,25% (P/V), Na₂EDTA 50 mM, Tris 10 M, pH 7,5

4.7. Precipitación de ADN

Los fragmentos de ADN obtenidos luego de la digestión con enzimas de restricción fueron aislados y concentrados, en determinados casos, mediante precipitación con isopropanol. Esto se efectuó con el fin de eliminar los fragmentos cortos de ADN liberados, las sales y las enzimas de restricción. Para esto, se llevó el volumen de la muestra a precipitar a 200 µL con agua Milli Q autoclavada y se adicionaron 20 µL de acetato de sodio 3 M. Luego, se agregó 0,6 vol. de isopropanol y se incubó a -70 °C por 20 min. Se centrifugó a 12.000 x *g* por 20 min a 4 °C y el *pellet* fue lavado con 300 µL de etanol 70% (V/V). Tras otra centrifugación a 12.000 x *g* por 5 min a 4 °C, el *pellet* obtenido fue secado en un bloque seco termostatzado a 37 °C, hasta eliminar completamente el agua de la muestra. Finalmente, el ADN fue resuspendido en el volumen deseado de agua Milli Q autoclavada.

4.8. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

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

La fracción de gel conteniendo la banda de interés se separó con bisturí y se colocó dentro de un tubo Eppendorf. Se agregaron 3 vol. de solución QG por cada volumen de gel (100 mg de gel equivalen aproximadamente a 100 µL). Se incubó durante 10 min en baño de agua a 50 °C, mezclando por inversión cada 2-3 min. La muestra se transfirió a una columna de purificación (*QIAquick spin column*) dentro de su respectivo tubo colector y se centrifugó durante 1 min a 13.000 x *g*. Se descartó el SN y se agregaron 0,5 mL de solución QG a la columna, procediendo a centrifugar en idénticas condiciones. Para lavar, se agregaron 0,75 mL de solución PE centrifugando durante 1 min a 13.000 x *g*. Se descartó el SN y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones para descartar toda la solución PE residual. Se transfirió la columna a otro tubo Eppendorf y el ADN se eluyó con 50 µL de agua MilliQ autoclavada.

La purificación se verificó analizando una alícuota mediante electroforesis en gel de agarosa. Se determinó la pureza y la concentración de los fragmentos mediante lectura espectrofotométrica.

4.9. Reacción de ligación de ADN

Para las reacciones de ligación se utilizó una relación inserto:plásmido 5:1 en un volumen de reacción de 20 µL, utilizando la enzima T4 DNA Ligase, según el protocolo indicado por el proveedor. La mezcla de reacción se incubó durante toda la noche (ON,

overnight) a 4 °C. El control de plásmido religado se llevó a cabo reemplazando el volumen correspondiente al inserto por agua autoclavada. Luego de la reacción de ligación, se utilizó la mezcla de reacción obtenida para transformar células *E. coli* TOP10 competentes.

4.10. Preparación de células *E. coli* TOP 10 competentes por el método químico

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

A partir de un banco celular de *E. coli* TOP 10 conservado a -70 °C, se realizó una estría sobre una placa de Agar-LB. Se cultivó durante 16-20 h a 37 °C. Se escogió al azar una de las colonias desarrolladas y se inoculó en 5 mL de caldo LB (cultivo *starter*), realizándose una nueva incubación a 37 °C durante 18 h con agitación a 180 rpm. Luego se realizó un repique tomando 500 µL del cultivo *starter* a 50 mL de medio M. Se dejó crecer durante 150 min a 37 °C, con agitación a 180 rpm, y luego se incubó en baño de hielo durante 10 min. Las bacterias fueron recuperadas por centrifugación a $2.500 \times g$ por 10 min a 4 °C; se descartó el SN, y se resuspendió el *pellet* celular en 500 µL de medio M frío. Luego, se agregaron 2,5 mL de *storage solution* y se mezcló completamente mediante agitación suave. Finalmente, se dispensaron alícuotas de 100 µL en criotubos, que fueron conservados a -70 °C.

Se realizó siempre un control de las células competentes preparadas, para asegurar la continuidad en la esterilidad del cultivo y estimar la eficiencia de transformación. Para ello, una vez conservadas las bacterias competentes durante al menos 16 h a -70 °C, se descongelaron 2 criotubos: uno de ellos se transformó con 100 ng de un vector con resistencia para ampicilina (control positivo) y el otro fue afectado por el mismo procedimiento, sólo que sin el agregado de ADN (control negativo). Finalizada la transformación, las células fueron distribuidas homogéneamente en placas de cultivo conteniendo Agar-LB. Las células competentes fueron utilizadas sólo cuando la placa del control negativo no mostró desarrollo de colonias y cuando se obtuvieron eficiencias de transformación adecuadas en el control positivo.

Medio M: LB, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 10 mM, glucosa 0,2% (P/V)

Storage solution: medio LB conteniendo glicerol 36% (P/V), PEG 12% (P/V) (MW7500), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 12 mM, esterilizado por filtración con membrana de 0,22 µm.

4.11. Transformación de células competentes

Para realizar la transformación se descongelaron 100 μ L de células competentes (*E. coli* TOP10) y se mezclaron con el ADN (mezcla de ligación o plásmido), incubando durante 30 min en baño de hielo. Posteriormente, el tubo se colocó en un baño a 42 °C durante 2 min e inmediatamente se transfirió nuevamente a hielo, incubándose durante otros 2 min. Se adicionaron 700 μ L de medio LB y se incubó durante 60 min a 37 °C con agitación a 180 rpm, con el propósito de permitir la recuperación de las bacterias de la situación de estrés a la cual fueron sometidas. Las células se cosecharon mediante centrifugación a 2.500 x *g* durante 5 min a TA, se descartaron 600 μ L de SN y el *pellet* se resuspendió en el volumen remanente de medio. Finalmente, la totalidad de la suspensión celular se distribuyó en forma homogénea sobre una placa conteniendo agar-LB, de manera de seleccionar las bacterias transformadas, y se incubó durante 16 h a 37 °C.

Además de la placa conteniendo las bacterias transformadas con la mezcla de ligación de interés (placa “V+I”), se sembraron tres placas adicionales para realizar los controles negativo, positivo y de vector religado (placa “VR”) correspondientes.

4.12. Chequeo de las transformaciones mediante PCR en colonia

Una vez realizado el análisis de los controles negativo, positivo y de vector religado, se procedió a evaluar la presencia de la construcción de interés. Para ello, se seleccionaron al azar colonias de la placa “V+I” y se resuspendieron en 10 μ L de agua estéril. De este volumen se tomaron 3 μ L como molde para amplificar el fragmento clonado en cada caso mediante PCR utilizando la enzima *EasyTaq* polimerasa (TransGen Biotech). La mezcla de reacción se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Tabla 1):

Tabla 1. Mezcla de reactivos para la PCR en colonia

Reactivo	Concentración final	Volumen de reacción por tubo (μ L)
EasyTaq® amplification buffer 5X	1X	3,3
dNTPs (10 mM c/u)	0,3 mM c/u	0,5
Oligonucleótidos		
Forward 10 μM	0,3 μ M	0,5
Reverse 10 μM	0,3 μ M	0,5
EasyTaq® DNA Polymerase	1-2,5 U	0,2
Templado	Suspensión bacteriana	3
Agua autoclavada	-	Csp 16,5

La reacción se llevó a cabo en termociclador (Biometra) de acuerdo con el programa que se indica a continuación:

Tabla 2. Programa de ciclado para la PCR en colonia

	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1. Desnaturalización inicial	94	2,0
2. Desnaturalización	94	1,0
3. <i>Annealing</i>	52	0,5
4. Extensión	72	1
5. Volver al paso 2, 30 veces	-	-
6. Extensión final	72	10
7. Conservación	4	-

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para amplificar los fragmentos de ADN correspondientes a rbFSH α , rbFSH β y rbFSH β -LD se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en la PCR en colonia

Oligonucleótido	Secuencia (sentido 5'-3')
EF Fw	GGCCTTTCCGTCCTCAGC
LV Rv	ATAGCATGATACAAAGGCAT

En todos los casos, los productos de PCR obtenidos se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa (sección 4.6 de este apartado).

Las colonias seleccionadas fueron amplificadas en 10 mL de medio LB suplementado con ampicilina y crecidas durante 16-20 h, a 180 rpm y 37 °C para la realización de la minipreparación de ADN plasmídico, la cual se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en la sección 4.3.1 de este apartado.

4.13. Criopreservación de cepas bacterianas

Para la conservación de bacterias, se procedió a cultivarlas durante 18 h a 37 °C en medio LB. Posteriormente, se tomaron 800 μ L del cultivo y se adicionaron 200 μ L de glicerol 50% (V/V) estéril, homogeneizando para asegurar la distribución del glicerol. Finalmente, fueron conservadas a -70 °C en criotubos.

4.14. Revitalización de cepas bacterianas

Para recuperar las bacterias congeladas, se tomó una alícuota del material criopreservado y se inoculó en medio LB. El criotubo se conservó nuevamente a -70 °C y el tubo inoculado se incubó a 37 °C durante 16 h.

5. Técnicas de cultivo celular

5.1. Líneas celulares

HEK 293T/17 (*Human Embryonic Kidney*)

Es un clon de la línea celular HEK derivada de riñón de embrión humano que expresa constitutivamente el antígeno T grande del virus de simio 40 (SV40). En particular, el clon 17 fue seleccionado específicamente por su elevada eficiencia de transfección. Fue obtenida de *American Type Culture Collection* (ATCC CRL-11268) y se utilizó para el ensamblado de partículas lentivirales necesarias para el proceso de transducción. Para su cultivo, se utilizó medio DMEM suplementado con 10% (V/V) de SFB y 2 mM de glutamina.

CHO-K1 (*Chinese Hamster Ovary*)

Es un clon de la línea celular CHO derivada de ovario de hámster chino adulto. Fue adquirida de ATCC (CCL-61) y se utilizó como huésped para la expresión de las variantes recombinantes de rbFSH. Para su cultivo en adherencia, se utilizó el medio DMEM/F12 suplementado con 5% (V/V) de SFB y 2 mM de glutamina. Para su cultivo en suspensión, se utilizó el medio CD BHK-21 PM y el medio EX-CELL® 302 suplementado con 4 mM glutamina.

Hibridoma P3A8

Es un clon productor del anticuerpo monoclonal (mAb) anti-hFSH β , obtenido y caracterizado en el Laboratorio de Cultivos Celulares (LCC). Para su cultivo se utilizó el medio DMEM suplementado con 5% (V/V) de SFB.

5.2. Medios de cultivo y suplementos para células animales

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

MEM (Minimum Essential Medium)

- | | |
|----------------------|------------------------|
| – MEM (Gibco) | 9,61 g.L ⁻¹ |
| – NaHCO ₃ | 2,20 g.L ⁻¹ |

- Gentamicina 0,05 g.L⁻¹

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

- DMEM (Gibco) 13,37 g.L⁻¹
- NaHCO₃ 3,70 g.L⁻¹
- Piruvato de sodio 0,11 g.L⁻¹
- Gentamicina 0,05 g.L⁻¹

DMEM/F-12 (DMEM/Nutrient Mixture F-12)

- DMEM/F-12 (Gibco) 12,00 g.L⁻¹
- NaHCO₃ 2,44 g.L⁻¹
- Gentamicina 0,05 g.L⁻¹

EX-CELL® 302

- EX-CELL® 302 (SAFC) 21,21 g.L⁻¹
- NaHCO₃ 1,60 g.L⁻¹
- Gentamicina 0,05 g.L⁻¹

CD BHK-21 Production Medium (PM)

- CD BHK-21 PM (Gibco) 17,70 g.L⁻¹
- NaHCO₃ 2,32 g.L⁻¹
- Gentamicina 0,05 g.L⁻¹

Suero fetal bovino (SFB)

Para preparar los medios de cultivo utilizados en cultivos en adherencia se adicionó a cada medio basal la concentración deseada de SFB. Se empleó SFB de calidad certificada (PAA Laboratories), el cual fue descomplementado mediante incubación en baño de agua termostatzado a 56 °C durante 30 min previo a su uso.

Buffer fosfato salino (PBS)

- KH₂PO₄ 0,60 g.L⁻¹
- Na₂HPO₄ 0,78 g.L⁻¹
- NaCl 8,80 g.L⁻¹
- pH 7,4

Tripsina-EDTA

- Tripsina (Gibco) 0,05% (P/V).
- Na₂EDTA 0,02% (P/V).
- *Buffer* PBS

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

Glutamina 200 mM

- Glutamina (Sigma-Aldrich) 29,30 g.L⁻¹
- Medio MEM

5.3. Sistemas de cultivo celular

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

5.3.1. Cultivos en adherencia

Se emplearon los siguientes sistemas de cultivo:

- Placas multipozos de poliestireno de 96, 24, 12 y 6 pozos con una superficie de 0,5; 2; 5 y 9,6 cm² por pozo, respectivamente
- Frascos T de 25, 75 y 175 cm² de superficie

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

5.3.2. Cultivos en suspensión en pequeña escala

Utilizando una incubadora orbital (Certomat CTplus, Sartorius) con atmósfera de CO₂ al 5% y control de humedad, se emplearon los siguientes sistemas de cultivo:

- Frascos Schott de 100, 250, 500 y 1000 mL

5.3.3. Cultivo en biorreactor tanque agitado de 1 L

Se empleó un sistema multivaso de 1 L de volumen de trabajo (BIOSTAT Qplus, Sartorius), compuesto de 6 biorreactores en forma paralela. En nuestro caso, se llevaron a cabo cultivos continuos en perfusión, utilizando un filtro tipo *spin* con una malla metálica de poro aproximado de 7 a 8 µm (Twilled Dutch Weave, BOPP), como dispositivo de retención celular. El biorreactor cuenta con todos los componentes periféricos necesarios para su operación, incluyendo: electrodo de oxígeno disuelto,

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

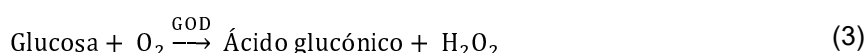
5.4. Determinaciones analíticas en cultivos celulares

5.4.1. Determinación de la concentración y viabilidad de células

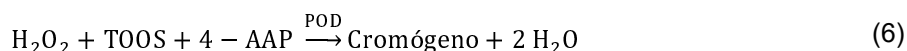
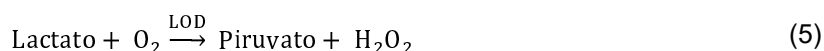
El recuento celular se realizó en cámara de Neubauer, estimando la proporción de células muertas por el método de exclusión con azul de tripán (157). La viabilidad del cultivo se determinó calculando el porcentaje de células viables con respecto a las totales, teniendo en cuenta que la concentración de células totales es la suma de la concentración de células viables y no viables.

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

Para la determinación de glucosa se empleó el método enzimático glucosa oxidasa (GOD)/peroxidasa (POD), haciendo uso del *kit* Glicemia (Wiener Lab). La determinación de glucosa por el método enzimático GOD/POD se basa en la oxidación específica de D-glucosa por parte de la enzima GOD, con formación en forma estequiométrica de peróxido de hidrógeno. Este último, en presencia de 4-aminoantipirina (4-AAP) y fenol, forma una quinoneimina roja mediante una reacción catalizada por la enzima POD. De esta manera, el dosaje espectrofotométrico del producto coloreado permite la cuantificación indirecta de glucosa en la muestra. El esquema de la reacción es el siguiente:



Para la determinación de lactato se empleó el método enzimático, haciendo uso del *kit* Lactate (Wiener Lab). La determinación de lactato por este método se basa en la oxidación específica del lactato por parte de la enzima lactato-oxidasa (LOD), con formación en forma estequiométrica de peróxido de hidrógeno. Éste último, en presencia de *N-Ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfofopropyl)-3-methylaniline* (TOOS) y 4-AAP, forma un cromógeno mediante una reacción catalizada por la enzima POD. De esta manera, el dosaje espectrofotométrico del producto coloreado permite la cuantificación indirecta de lactato en la muestra. El esquema de la reacción es el siguiente:



5.4.3. Estimación de parámetros cinéticos de cultivo. Determinación de la integral de células viables (ICV), velocidad específica de crecimiento celular y velocidad específica de consumo y producción de metabolitos

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

$$\frac{dP}{dt} = X_v(t) \cdot q_p \quad (7)$$

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

$$P(t) = \int dP = q_p \int X_v(t) dt \quad (8)$$

Esta expresión indica que la concentración de la variable en estudio en cualquier tiempo t es proporcional a la integral en el tiempo de la curva de células viables, o ICV, en el mismo tiempo t (158). De esto se desprende que la curva de producción o consumo de la especie y la curva integral deben mostrar perfiles análogos, y que la regresión de una sobre la otra debe ser lineal. La ICV constituye, por lo tanto, una medida de la cantidad de células metabólicamente activas presentes en un cultivo durante un período discreto de tiempo, las cuales determinan la concentración de una especie P en cada tiempo t, con una productividad específica q_p . La ICV tiene unidades de cél.h.mL^{-1} .

Una vez estimados los valores de ICV, las velocidades específicas de crecimiento celular, de consumo y producción se calcularon graficando el número de células viables a cada tiempo de cultivo en función de la ICV. A partir de cada gráfica, se realizaron los ajustes lineales correspondientes y se obtuvieron los valores de los

parámetros cinéticos q_p a partir de las pendientes de las rectas de ajuste. El criterio adoptado para aplicar la regresión lineal fue seleccionar aquellos puntos experimentales que permitieran obtener coeficientes de correlación iguales o superiores a 0,95. En todos los casos, los cálculos se realizaron utilizando el software *Origin 9.0* (OriginLab).

5.5. Criopreservación de líneas celulares de mamífero

La conservación de las líneas y clones celulares se realizó en nitrógeno líquido, ya que a temperaturas de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ se observan deterioros celulares mínimos. Se empleó una técnica de enfriamiento gradual desde TA hasta $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para ello, una vez realizado el recuento, suspensiones celulares en fase de crecimiento exponencial se centrifugaron a $200 \times g$ durante 5 min a TA. Se descartó el SN y el sedimento celular se resuspendió en una solución de medio de cultivo y dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) en una relación 90:10 (V/V), de manera de obtener una concentración de $1 \times 10^7\text{ cél.mL}^{-1}$. La suspensión celular se distribuyó a razón de 1 mL por criotubo, los cuales luego fueron colocados en un contenedor apropiado (*MrFrosty*, Nalgene), y llevados a un freezer de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Este dispositivo contiene alcohol isopropílico, permitiendo que en su interior la temperatura disminuya a razón de $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por minuto, logrando un enfriamiento gradual de las células que permite su correcta revitalización. Finalmente, los criotubos se almacenaron en termos de N_2 líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.6. Revitalización de líneas celulares de mamífero

La descongelación rápida de la suspensión celular es esencial para su óptima recuperación. Para la revitalización de las líneas celulares criopreservadas se retiró el criotubo del termo de N_2 líquido y se lo sumergió rápidamente en un baño de agua a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. La suspensión celular descongelada se transfirió a un tubo cónico que contenía 40 mL de medio de cultivo y se centrifugó a $200 \times g$ durante 5 min a TA. Esta etapa se realizó con el objeto de diluir rápidamente el DMSO y luego eliminarlo, ya que es un reactivo tóxico para las células en cultivo. Se descartó el SN y el sedimento celular se resuspendió en un volumen de medio de cultivo adecuado. Finalmente, se realizó el recuento celular con el fin de evaluar la recuperación y la viabilidad celular.

5.7. Desarrollo de líneas celulares recombinantes

5.7.1. Ensamblado de partículas lentivirales (PLs)

Para el ensamblado de las PLs, se llevó a cabo una transfección transitoria de células HEK 293T/17 empaquetadoras, cosechando las PLs a partir del SN de cultivo

luego de 48 h. Para ello, las células HEK 293T/17 se cultivaron a razón de 4×10^5 cél.mL⁻¹ en una placa de Petri para cultivo celular de 10 cm de diámetro, ON a 37 °C, 5% CO₂. Al día siguiente, se adicionaron 22,6 µL de reactivo de transfección en un tubo cónico conteniendo 2,5 mL de medio DMEM, respetando una relación de 1 µL de lípidos cada 1 µg de ADN. Se homogeneizó vigorosamente e incubó a TA por 5 min. En otro tubo cónico conteniendo 2,5 mL de medio DMEM se adicionó el volumen necesario de la solución de cada vector para que contenga las siguientes cantidades: 2,5 µg de pRSV-REV, 3,6 µg de pMD2.G, 6,5 µg de pMDLg/pRRE y 10 µg del vector de transferencia correspondiente. Se mezcló el contenido de ambos tubos y se incubó a TA durante 20 min. A continuación, se retiró el SN de cultivo de las células HEK 293T/17 y se adicionaron los 5 mL de solución conteniendo los complejos lípidos/ADN sobre la monocapa celular. Se incubó 4 h a 37 °C y 5% CO₂. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se descartó el SN de cultivo y se adicionaron 10 mL de medio DMEM conteniendo 10% de SFB. Se incubó por 48 h a 37 °C y 5% CO₂. Posteriormente, se cosechó el SN de cultivo conteniendo las PLs y se trasvasó a un tubo cónico. Se centrifugó a 200 x g durante 10 min para retirar células que pudieran haberse despegado de la monocapa y, finalmente, se fraccionó en alícuotas de 0,5 mL en tubos eppendorf, conservándose a -70 °C.

Vectores lentivirales de tercera generación: pMDLg/pRRE, pMD2.G, pRSV REV (Addgene; número de plásmido #12251, #12259, #12253, respectivamente); vectores de transferencia: pLV-EF1α-rbFSHα, pLV-EF1α-rbFSHβ y pLV-EF1α-rbFSHβ-LD.

Reactivo de transfección: Lípidos catiónicos FreeStyle™ MAX (FSM), Gibco.

Medio de transfección: DMEM (Gibco).

5.7.2. Transducción de células de mamífero con LPs

Para obtener líneas celulares recombinantes estables se llevaron a cabo transducciones de cultivos de células sCHO-K1 (línea celular CHO-K1 adaptada al crecimiento en suspensión en nuestro laboratorio) en placas (condición de adherencia), utilizando las PLs producidas previamente. Para ello, la línea sCHO-K1 se cultivó en condiciones de adherencia, utilizando medio DMEM/F12 5% SFB, a una densidad de $3,5 \times 10^4$ cél.mL⁻¹ en placas de 6 pozos, ON a 37 °C, 5% CO₂. Al día siguiente, se retiró el SN de cultivo y se adicionaron 0,5 mL de PLs de rbFSHα y 0,5 mL de PLs de rbFSHβ o rbFSHβ-LD, previamente atemperadas, las cuales se mantuvieron en contacto con las células ON a 37 °C, 5% CO₂. Al día siguiente, se retiró el SN conteniendo las PLs y se sustituyó por medio DMEM/F12 5% SFB. Una vez que las células alcanzaron

aproximadamente un 90% de confluencia, se subcultivaron para realizar una nueva transducción en idénticas condiciones.

Al momento del subcultivo, para cada una de las transducciones (3 a 4 en total), se mantuvo una alícuota de la suspensión celular sin transducir, con el fin de evaluar posteriormente la expresión de las proteínas en el SN de cultivo.

5.7.3. Selección de células recombinantes

Para seleccionar las células recombinantes, las líneas celulares generadas fueron sometidas a presión de selección mediante la adición de puromicina al medio de cultivo.

La puromicina es un antibiótico inhibidor de la traducción dado que posee una estructura química análoga al extremo aminoaciladenosina del aminoacil-ARNt, lo que le permite acoplarse al sitio A del ribosoma e inhibir la entrada del aminoacil-ARNt. Por otro lado, la molécula posee un grupo α -amino capaz de formar un enlace peptídico con el grupo carboxilo de la cadena peptídica, inhibiendo la síntesis de proteínas por liberación prematura de las cadenas polipeptídicas.

El protocolo utilizado fue desarrollado en nuestro laboratorio (159) y consistió en la incubación de las células transducidas con concentraciones crecientes del agente de selección. Inicialmente, se adicionó una concentración $5 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de puromicina al medio de cultivo. Una vez que se observó únicamente crecimiento de células resistentes a dicha concentración, se realizó un subcultivo en presencia de una concentración mayor del antibiótico. Este procedimiento se repitió tantas veces como fue necesario (10, 50, $100 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de puromicina) hasta alcanzar el nivel de expresión deseado (analizado por la metodología correspondiente), o hasta que el cultivo demostró una baja viabilidad, conservándose entonces la línea celular resistente a la última concentración tolerada del agente de selección.

5.8. Obtención de clones celulares

El clonado celular de las líneas obtenidas se realizó mediante el método de dilución límite (160,161). El mismo consiste en preparar una suspensión celular diluida de manera tal de obtener, en promedio, una única célula por unidad de volumen de medio de cultivo, el cual luego es dispensado en pozos de una placa de microtitulación. La probabilidad estadística de obtener pocillos con un único clon se puede incrementar reduciendo la densidad de siembra hasta alcanzar una proporción de aproximadamente una célula cada 5 o 10 pozos. Debido a las bajas densidades celulares que se emplean en este tipo de clonado, el medio de cultivo debe contener suficiente cantidad de nutrientes y factores de crecimiento que no son aportados por las células vecinas como

ocurre en los cultivos densos. Por este motivo, se suelen emplear altas concentraciones de SFB y/o medios condicionados por el crecimiento de otras células, o capas de células alimentadoras. El clonado se considera efectivo cuando se observa crecimiento, como máximo, en el 30% de los pozos sembrados con una proporción de una célula cada 10 pozos y una célula por pozo.

Con este fin, se preparó una suspensión celular de las líneas a clonar con una densidad de 5 cél.mL⁻¹ en medio DMEM/F-12 suplementado con 20% (V/V) SFB y se sembraron placas de 96 pozos por quintuplicado, a razón de 200 µL por pozo, con el objetivo de obtener aproximadamente 1 célula por pocillo. Los pozos que evidenciaron crecimiento de un único clon fueron seleccionados y amplificados mediante sucesivos pasajes a placas de 24 y 6 pozos, y frascos T de 25 cm², hasta obtener una cantidad suficiente de células de cada clon para su criopreservación y análisis.

5.9. Adaptación de células a crecimiento en suspensión en medio de cultivo libre de SFB

Diversas metodologías pueden llevarse a cabo para adaptar un cultivo, que crece en condiciones de adherencia y utilizando una elevada concentración de SFB en el medio (entre 5 y 10%), a crecer en suspensión utilizando medio de cultivo libre de SFB (SFM). El proceso puede realizarse de forma gradual, realizando progresivos subcultivos en medios con concentraciones de SFB cada vez menores. Esta reducción gradual del SFB se realiza a la par de un aumento gradual de la proporción de medio SFM, hasta llegar a un 100% de SFM con 0% de SFB. En algún punto de esta transición, las células se despegarán del sustrato en el que crecen adheridas y pasarán a suspensión (a veces formando agregados o cúmulos celulares), donde generalmente son cultivadas en agitación, como una nueva variable de cultivo. Esta estrategia fue la empleada en el presente trabajo para adaptar las líneas celulares al crecimiento en suspensión en SFM [CD BHK-21 *production medium* (PM)].

Para lograr este objetivo, en primer lugar, se adaptaron las líneas celulares desarrolladas desde su crecimiento en condición de adherencia (medio DMEM/F-12 suplementado con 5% SFB, medio A) al medio EX-CELL302 (medio B) utilizando sucesivas proporciones volumétricas de medio de cultivo A y B (A:B): 50:50 (2.5% SFB), 25:75 (1,25% SFB), 15:85 (0,75% SFB), 10:90 (0,5% SFB) y 0:100 (0% SFB). Posteriormente, una vez que las células fueron adaptadas al medio B, se cultivaron a 37 °C en agitador orbital (140 rpm, 5% CO₂), y se comenzó su adaptación al medio PM (medio C) utilizando sucesivas proporciones volumétricas de medio de cultivo B y C (B:C): 50:50, 25:75 y 0:100. En todos los casos, diariamente se evaluó la viabilidad y densidad celular. Los cultivos en adherencia fueron subcultivados cada vez que se

alcanzaba la confluencia. Los cultivos en suspensión se mantuvieron a densidades celulares entre $1,0 \times 10^6$ cél.mL⁻¹ y $2,0 \times 10^6$ cél.mL⁻¹. Cuando la densidad celular disminuyó a valores por debajo del límite inferior, las células se centrifugaron a $200 \times g$ durante 10 min y se resuspendieron en el mismo medio de cultivo condicionado a una densidad de $1,0 \times 10^6$ cél.mL⁻¹. Cuando la densidad celular superó el valor máximo, las células se diluyeron con medio nuevo, hasta alcanzar una densidad celular de $1,0 \times 10^6$ cél.mL⁻¹. Se consideró que las células estaban adaptadas al nuevo medio cuando se requería un reemplazo diario de al menos el 50% del volumen del medio.

Algunas células animales poseen la capacidad de adaptar su crecimiento a SFM en suspensión más fácilmente que otras, pudiendo realizarse una adaptación directa desde un medio conteniendo 5 a 10% SFB a un medio totalmente libre del mismo. Esta estrategia fue utilizada en el presente trabajo para la adaptación de los clones celulares al crecimiento en suspensión en SFM (medio PM). Para lograr este objetivo, un cultivo de los clones celulares en condición de adherencia (medio DMEM/F-12 suplementado con 5% SFB) en fase exponencial de crecimiento fue subcultivado en 100% de medio PM a una densidad de $1,0 \times 10^6$ cél.mL⁻¹ en frascos Schott, incubándose a 37 °C en agitador orbital (140 rpm, 5% CO₂). Posteriormente, se siguieron los mismos criterios utilizados para la adaptación a suspensión de las líneas celulares.

5.10. Determinación de la productividad celular específica

Para determinar la productividad específica de las variantes de rbFSH, se cultivaron células sCHO-K1 en placas a una densidad de 4×10^5 cél.mL⁻¹. Luego de 24 o 48 h, se determinó la concentración de la hormona en el SN de cultivo y el número de células mediante técnica de ELISA sándwich y recuento celular, respectivamente. En el caso de las células sCHO-K1 cultivadas en condición de suspensión, se procedió de igual modo pero partiendo de una densidad celular de 7×10^5 cél.mL⁻¹ en frascos Schott. Posteriormente, la productividad específica se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Productividad (pg.cel.día}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Concentración (pg.mL}^{-1}\text{)}}{\frac{C_i + C_f}{2} (\text{cél.mL}^{-1}) \times t(\text{día})} \quad (9)$$

Donde C_i es la concentración de células sembradas, C_f la concentración de células al término del cultivo y t es el tiempo de incubación.

6. Purificación de variantes rbFSH

6.1. Cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados (IMAC)

Las variantes de rbFSH fueron purificadas a partir de SN de cultivo utilizando 11 mL de resina IMAC *Sepharose 6 FF* (Cytiva), empaquetada en una columna XK 16/20 de 1,6 x 2,48 cm, conectada a un *ÄKTA explorer 100 Air* (GE Healthcare). La resina IMAC fue activada utilizando el siguiente protocolo:

- **Lavado 1:** la matriz se lavó con 4 VC (volumen de columna) de H₂O.
- **Activación:** se aplicaron 5 VC de una solución de NiCl₂ 100 mM.
- **Lavado 2:** la matriz se lavó con 5 VC de H₂O.

Todas las etapas se llevaron a cabo a un flujo de 2,2 mL.min⁻¹.

Antes de comenzar el protocolo de purificación, se llevó a cabo el acondicionamiento de la muestra con el fin de lograr la interacción apropiada entre la proteína y la matriz. Para ello, los SN conteniendo la proteína fueron ajustados a una condición final consistente en imidazol 20 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,4, mediante el agregado de soluciones concentradas de imidazol (1 M), NaCl (5 M) y HCl. Finalmente, la muestra se clarificó empleando un filtro de membrana de 0,45 µm (acetato de celulosa, Sartorius, Alemania).

El protocolo de la purificación se describe a continuación:

- **Blanco:** la matriz se lavó con 5 VC de buffer PNI-200, con el fin de lavar los iones Ni²⁺ débilmente unidos.
- **Equilibrado:** la matriz se equilibró con 8 VC de buffer PNI-20.
- **Siembra:** se sembró un volumen apropiado de la muestra acondicionada y se recolectó el FT (*flow-through*) en una única fracción para su posterior análisis.
- **Lavado 1:** la matriz se lavó con 10 VC de buffer PNI-20.
- **Lavado 2:** la matriz se lavó con 6 VC de buffer PNI-50 (rbFSH-LD) o PNI-75 (rbFSH).
- **Elución:** se aplicaron 5 VC de buffer PNI-200. Las fracciones de elución se recolectaron y se conservaron a -20 °C para su posterior análisis.

Buffer PNI-20: fosfato de sodio 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 20 mM, pH 7,4

Buffer PNI-50: fosfato de sodio 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 50 mM, pH 7,4

Buffer PNI-75: fosfato de sodio 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 75 mM, pH 7,4

Buffer PNI-200: fosfato de sodio 20 mM, NaCl 0,5 M, imidazol 200 mM, pH 7,4

Todas las etapas se llevaron a cabo a un flujo de 2,2 mL.min⁻¹. Luego del paso de elución, se realizó el siguiente protocolo para el reacondicionado y conservación de la matriz:

- **Lavado 1:** se aplicaron 5 VC de buffer de lavado para eliminar el imidazol de la matriz, a un flujo de 4,0 mL.min⁻¹.
- **Stripping:** se aplicaron 5 VC de buffer de *stripping* para eliminar los iones Ni²⁺ de la matriz, a un flujo de 2,2 mL.min⁻¹.
- **Lavado 2:** se aplicaron 5 VC de buffer de lavado a un flujo de 4,0 mL.min⁻¹.
- **Sanitizado:** con el fin de eliminar posibles restos de proteína retenidos en la columna, la misma se lavó con 5 VC de una solución de sanitización a un flujo de 1,0 mL.min⁻¹.
- **Neutralizado:** para eliminar los restos del lavado anterior, se realizó un último lavado con 5 VC de buffer de lavado a un flujo de 2,2 mL.min⁻¹.
- **Conservación de la matriz:** con el propósito de conservar la resina para usos posteriores, se lavó con 5 VC de solución de conservación a un flujo de 2,2 mL.min⁻¹ y se guardó a 4 °C hasta su reutilización.

Buffer de lavado: fosfato de sodio 20 mM, pH 7,4

Buffer de stripping: fosfato de sodio 20 mM, NaCl 0,5 M, EDTA 50 mM, pH 7,4

Solución de sanitización: NaOH 0,1 M

Solución de conservación: Etanol 20% (V/V)

6.2. Evaluación del proceso de purificación

La concentración de las proteínas en las distintas fracciones de purificación fue determinada mediante ELISA (sección 7.3). La concentración de las proteínas luego de la diafiltración (sección 6.3) fue calculada mediante lectura espectrofotométrica a $\lambda=280$ nm. Para esto, se emplearon los coeficientes de extinción de cada proteína descriptos en la sección 8.2.1 de este apartado.

La pureza se evaluó mediante SDS-PAGE con posterior coloración con azul brillante de Coomassie, como se explica en la sección 8.1.1 de este apartado, respectivamente.

6.3. Concentración y diafiltración

Las fracciones de elución conteniendo la proteína de interés fueron concentradas y diafiltradas contra *buffer* fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4, mediante filtración por flujo tangencial (TFF) utilizando un dispositivo Pellicon 3 mini (Millipore, Merck).

7. Desarrollo de un método para la cuantificación de variantes de rbFSH mediante ELISA sándwich (sELISA)

7.1. Obtención de anticuerpos policlonales anti-rbFSH

7.1.1. Plan de inmunización

Con el objetivo de obtener anticuerpos policlonales (pAb) anti-rbFSH se realizó un protocolo de inmunización utilizando un conejo hembra de la raza New Zealand de 3 meses de edad, el cual se inoculó con 100 µg de rbFSH (purificada siguiendo el protocolo descrito en la sección 6.1 de este apartado). Se realizó una primera inmunización preparando una emulsión con adyuvante completo de Freund, seguido de dos inmunizaciones adicionales empleando adyuvante incompleto de Freund. Las inoculaciones se realizaron mediante vía subcutánea (s.c.) en la región dorsal del animal utilizando aproximadamente 1 mL de la mezcla en 10 sitios diferentes de dicha región (inoculación multisitio). Entre los 7 y 9 días posteriores a la última inmunización se realizó la extracción de suero a partir de la vena marginal de la oreja.

El título de anticuerpos se estableció como la máxima dilución del suero que genera un valor de absorbancia superior al valor de corte (*cut-off*), calculado como el promedio del blanco (sin suero) más tres desviaciones estándar.

7.1.2. Evaluación del título de anticuerpos anti-rbFSH

La evaluación del título de los anticuerpos policlonales obtenidos se efectuó mediante ELISA específico indirecto. Para ello, se sensibilizaron placas de ELISA de 96 pozos a razón de 100 µL por pozo de una solución de rbFSH 1 µg.mL⁻¹ (100 ng por pozo) diluida en *buffer* de sensibilización, durante 1 h a 37 °C, seguido de una incubación ON a 4 °C. Luego, se bloquearon los sitios de interacción inespecífica con 200 µL por pozo de *buffer* de bloqueo durante 1 h a 37 °C. A continuación, se incubaron las muestras en diluciones seriadas 1:2 utilizando *buffer* diluyente por 1 h a 37 °C. Posteriormente, se adicionaron 100 µL por pozo de anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas (Igs) de conejo conjugados con la enzima peroxidasa (ThermoFisher) en una dilución 1:2.000 preparada en *buffer* diluyente, incubando durante 1 h a 37 °C. Finalmente, se llevó a cabo el revelado mediante incubación de 100 µL por pozo de *buffer* de revelado durante 15 min a TA en oscuridad, deteniéndose la reacción mediante el agregado de 50 µL por pozo de H₂SO₄ 2 N. Se midió la absorbancia a λ= 492 nm en un lector de placas (Labsystems Multiskan®). Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda. Después de cada etapa, se realizaron seis lavados con PBS-T.

Buffer de sensibilización: Na₂CO₃/NaHCO₃ 50 mM, pH 9,6

Buffer de bloqueo: leche descremada 2% (P/V) en PBS

Buffer diluyente: leche descremada 0,2% (P/V) en PBS-T

Buffer de revelado: H₂O₂ 0,015 vol., OPD (diclorhidrato de O-fenilendiamina) 0,5 mg.mL⁻¹ en *buffer* citrato/fosfato de sodio 50 mM, pH 5,3

PBS-T: Tween-20 0,05% (V/V) en PBS

7.2. Producción de anticuerpos monoclonales anti-hFSH β

7.2.1. Cultivo de hibridoma y producción de anticuerpos monoclonales (mAb) anti-hFSH β

La producción del mAb anti-hFSH β se realizó mediante el cultivo *in vitro* del hibridoma P3A8. Para ello, se sembraron frascos T75 a una densidad celular de 3×10^5 cél.mL⁻¹ en medio DMEM suplementado con 5% SFB (V/V) y se cultivaron a 37 °C, 5% CO₂. Luego de 48 h, el SN de cultivo fue cosechado y clarificado mediante centrifugación a 4000 x g durante 10 min y almacenado a -20 °C hasta su utilización.

7.2.2. Purificación del mAb P3A8 mediante cromatografía de afinidad a proteína A

La purificación del mAb P3A8 anti-hFSH β a partir de SN de cultivo se realizó empleando 7,6 mL de una resina de proteína A *Sepharose* (MabSelect SuRe™, GE Healthcare) empaquetada en una columna XK 16/20 de 1,6 x 2,48 cm, conectada a un ÄKTA explorer 100 Air.

Antes de comenzar el protocolo de purificación, se llevó a cabo el acondicionamiento de la muestra con el fin de lograr la interacción apropiada entre la porción Fc del anticuerpo y la proteína A. El SN se ajustó a una concentración de NaCl 3 M, pH 9,0 mediante el agregado de NaCl sólido y solución de Tris-HCl 1 M, pH 9,0. Finalmente, la muestra se centrifugó a 4.000 x g por 5 min y luego se clarificó con filtro de membrana de 0,45 μ m (acetato de celulosa).

El protocolo de la purificación se describe a continuación:

- **Equilibrado:** la matriz se equilibró con 5 VC de *buffer* de equilibrado a un flujo de 1,2 mL.min⁻¹.
- **Siembra:** la muestra acondicionada se sembró a un flujo de 0,6 mL.min⁻¹. Se recolectó el FT para su posterior análisis.
- **Lavado 1:** la matriz se lavó con 5 VC de *buffer* de equilibrado.
- **Elución por descenso de pH:** se aplicaron 10 VC de *buffer* de elución a un flujo de 0,6 mL.min⁻¹. Las fracciones de elución se recolectaron y neutralizaron con *buffer* de neutralización. Se conservaron a -20 °C para su posterior análisis.

- **Lavado 2:** se aplicaron 5 VC de *buffer* de lavado para neutralizar el pH ácido a un flujo de 1,2 mL.min⁻¹.
- **Sanitizado:** con el fin de eliminar posibles restos de proteína retenidos en la columna, la misma se lavó con 2 VC de una solución de sanitización a un flujo de 1,0 mL.min⁻¹.
- **Lavado 3:** para eliminar los restos del lavado anterior, se realizó un último lavado con 5 VC de *buffer* de lavado a un flujo de 1,2 mL.min⁻¹.
- **Conservación de la matriz:** con el propósito de conservar la resina para usos posteriores, se lavó con 2 VC de solución de conservación a un flujo de 1,2 mL.min⁻¹, y se guardó a 4 °C hasta su reutilización.

Buffer de equilibrado: NaCl 3 M, Tris-HCl 20 mM, pH 9,0

Buffer de elución: cítrico/citrato 100 mM, pH 3,0

Buffer de neutralización: Tris-HCl 1 M, pH 9,0

Buffer de lavado: fosfato de sodio 20 mM, pH 7,0

Buffer de sanitización: NaOH 0,1 M, NaCl 1 M

Buffer de conservación: etanol 20% (V/V), fosfato de sodio 20 mM, pH 7,0

Finalizado el proceso cromatográfico, se mezclaron las fracciones correspondientes al pico de elución, las cuales fueron monitoreadas por lectura de absorbancia a $\lambda = 280$ nm.

7.2.3. Evaluación del proceso de purificación

La concentración del mAb P3A8 purificado fue calculada mediante lectura espectrofotométrica a $\lambda = 280$ nm empleando como blanco de lectura el *buffer* de elución neutralizada con *buffer* de neutralización. Para esto, se empleó la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de Ig (mg. ml}^{-1}\text{)} = (A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}})_{280\text{nm}} \times 0,8 \quad (10)$$

La pureza del anticuerpo se evaluó mediante SDS-PAGE con posterior coloración con azul brillante de Coomassie, como se explica en la sección 8.1.1 de este apartado.

7.3. Optimización de un sELISA para la cuantificación de variantes de rbFSH mediante diseño experimental (DoE)

Este ensayo consistió en la captura de las variantes de rbFSH por el mAb P3A8 inmovilizado sobre placas de poliestireno. La detección específica de la proteína se realizó mediante incubación con el pAb de conejo anti-rbFSH, cuya presencia se reveló mediante incubación con un anticuerpo de cabra anti-Igs de conejo conjugado a la

enzima peroxidasa (conjugado-HRP), que, *a posteriori*, catalizó la conversión de un sustrato incoloro en una sustancia coloreada. La optimización de las condiciones del ensayo se llevó a cabo mediante la metodología de superficie de respuesta (RSM), partiendo de un diseño experimental de tipo Box Behnken (BBD) con tres factores (mAb de captura, pAb de detección y conjugado-HRP) y quintuplicado en el punto central. Todas las condiciones se evaluaron por duplicado. Se incluyó una condición control adicional, con un total de N=36 experimentos (N=18 condiciones). Los niveles de cada factor se seleccionaron en función de resultados preliminares y se listan en la Tabla 4.

Tabla 4. Factores y sus niveles

Factor	Niveles	
A: mAb P3A8 de captura (ng por pozo)	50	200
B: pAb de detección (dilución)	1:5000	1:2000
C: Conjugado-HRP (dilución)	1:5000	1:1000

Se calcularon las siguientes cifras de mérito del método: sensibilidad (SEN), límite de detección (LOD, *limit of detection*), límite de cuantificación (LOQ, *limit of quantification*) y rango lineal, según la Guía de Validación de Métodos Bioanalíticos para la Industria establecida por ICH (*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*) (162,163).

A continuación, se describen las principales cifras de mérito:

Sensibilidad de la calibración: es el cambio en la señal de la respuesta por unidad de cambio en la concentración del analito, es decir, la pendiente de la recta de calibrado.

$$SEN = \text{pendiente} \quad (11)$$

Límite de detección: se define como la cantidad o concentración mínima de analito que puede ser detectada de manera confiable por un método analítico determinado.

$$LOD = 3.3 \times S_0 \quad (12)$$

Donde, S_0 es el desvío estándar de la concentración predicha para una muestra blanco.

Límite de cuantificación: es la mínima concentración cuantificable en forma confiable. Este parámetro se toma como la concentración correspondiente a 10 veces el desvío estándar (en unidades de concentración) del blanco.

$$LOQ = 10 \times S_0 \quad (13)$$

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

$$S_{x_{inc}} = \frac{S_{fit}}{A} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(x_{inc} - \bar{x})^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (14)$$

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

Si se analiza una muestra por triplicado (lo más usual es $m=3$), en la que el analito no está presente ($x_{inc} = 0$), la ecuación (14) se reduce a:

$$S_0 = \frac{S_{fit}}{A} \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (15)$$

Se considera que el rango lineal comprende desde la menor concentración que puede medirse (LOQ) hasta la pérdida de la linealidad. El estudio de la linealidad se realizó a partir de la prueba F (p asociado $>0,05$). Asimismo, se evaluó la exactitud (grado de concordancia entre el valor considerado verdadero y el determinado por el método analítico validado), comparando la respuesta de un estándar interno a 3 niveles de concentración (alto, medio y bajo) ($n=3$) con la respuesta obtenida de dicho estándar fortificado en diferentes matrices: una dilución 1:50 de SN de cultivo condicionado por células sCHO no recombinantes, y distintas diluciones (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32) de plasma de ratas. La precisión del ensayo se evaluó en dos niveles: repetibilidad y precisión intermedia (diferentes días), y se analizó mediante los coeficientes de variación inter e intra (CV%) ensayo.

Para llevar a cabo el ensayo, se sensibilizaron placas de ELISA de 96 pozos a razón de 100 μ L por pozo del mAb P3A8 (según las condiciones de la Tabla 5) diluida en *buffer* de sensibilización, durante 1 h a 37 °C, seguido de una incubación ON a 4 °C. Luego, se bloquearon los sitios de interacción inespecífica con 200 μ L por pozo de *buffer* de bloqueo, incubando durante 1 h a 37 °C. A continuación, se incubaron las muestras en diluciones seriadas 1:2 utilizando *buffer* diluyente ON a 4 °C. Posteriormente, se incubaron 100 μ L por pozo de una dilución apropiada (según Tabla 5) del pAb de detección, durante 1 h a 37 °C, seguido de una incubación de 100 μ L por pozo de una dilución apropiada (según Tabla 5) del conjugado-HRP, durante 1 h a 37 °C. Finalmente, se reveló incubando 100 μ L por pozo de *buffer* de revelado durante 15 min a 37 °C en oscuridad, deteniéndose la reacción mediante el agregado de 50 μ L por pozo de H_2SO_4 2 N. Se midió la absorbancia a $\lambda = 492$ nm en un lector de placas. Las diluciones se

realizaron en *buffer* diluyente. Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda. Luego de cada etapa, se realizaron seis lavados con PBS-T.

Buffer de sensibilización: Na₂CO₃/NaHCO₃ 50 mM, pH 9,6

Buffer de bloqueo: leche descremada 2% (P/V) en PBS

Buffer diluyente: leche descremada 0,2% (P/V) en PBS-T

Buffer de revelado: H₂O₂ 0,015 vol., OPD 0,5 mg.mL⁻¹ en *buffer* citrato/fosfato de sodio 50 mM, pH 5,3

PBS-T: Tween-20 0,05% (V/V) en PBS

Tabla 5. Condición para cada experimento del BBD

Orden estándar	Niveles		
	A	B	C
1	50	1:5000	1:1667
2	200	1:5000	1:1667
3	50	1:2000	1:1667
4	200	1:2000	1:1667
5	50	1:2857	1:5000
6	200	1:2857	1:5000
7	50	1:2857	1:1000
8	200	1:2857	1:1000
9	125	1:5000	1:5000
10	125	1:2000	1:5000
11	125	1:5000	1:1000
12	125	1:2000	1:1000
13	125	1:2857	1:1667
14	125	1:2857	1:1667
15	125	1:2857	1:1667
16	125	1:2857	1:1667
17	125	1:2857	1:1667
Control	200	1:4000	1:1000

8. Caracterización analítica de las variantes de rbFSH

8.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La masa molecular aparente y la pureza de las variantes de rbFSH producidas fueron evaluadas mediante ensayos de SDS-PAGE. La electroforesis en geles de poliacrilamida se desarrolló siguiendo esencialmente el método descrito por Laemmli (1964), utilizando para el armado de los geles el sistema de electroforesis modular vertical

Mini Protean 3 (Bio-Rad). Todos los geles fueron realizados en condiciones desnaturalizantes, agregando el detergente iónico dodecilsulfato de sodio (SDS). Para ello, se utilizó un gel de apilamiento con una concentración de acrilamida/bisacrilamida del 5% (P/V) y un gel de separación con una concentración de acrilamida/bisacrilamida del 12% (P/V). Las muestras se mezclaron con *buffer* de siembra 4X (con o sin agente reductor, de acuerdo al caso) en proporción muestra/*buffer* de 3:1. En algunos experimentos, las muestras fueron sometidas a tratamiento térmico durante 5 min a 100 °C. La corrida electroforética se llevó a cabo en *buffer* de corrida, a un voltaje constante de 200 V, sumergiendo el módulo en baño de hielo. La corrida se detuvo cuando el frente de corrida alcanzó una distancia de 0,5 cm desde el borde inferior del gel de separación.

Buffer de siembra 4X: Tris-HCl 200 mM, SDS 8% (P/V), glicerol 40% (V/V), azul de bromofenol 0,2% (P/V), pH 6,8

Buffer de siembra 4X reductor: Tris-HCl 200 mM, SDS 8% (P/V), glicerol 40% (V/V), azul de bromofenol 0,2% (P/V), β-mercaptoetanol (β-ME) 10% (V/V), pH 6,8

Buffer de corrida: Tris-HCl 25 mM, glicina 200 mM, SDS 0,1% (P/V)

8.1.1. Detección mediante tinción con azul brillante de Coomassie

Luego de la corrida electroforética, el gel se lavó 3 veces con H₂O durante 5 min para eliminar el SDS remanente. A continuación, se sumergió durante 15 min en solución de azul brillante de Coomassie (CBB). Posteriormente, se transfirió a la solución decolorante I durante 15 min y, finalmente, a la solución decolorante II hasta la aparición de bandas nítidas y disminución de la tinción de fondo. Todas las incubaciones y lavados se realizaron en agitación a TA.

Solución CBB: azul brillante de Coomassie R-250 0,125% (P/V), etanol 45% (V/V), ácido acético 10% (V/V)

Solución decolorante I: etanol 45% (V/V), ácido acético 10% (V/V)

Solución decolorante II: etanol 10% (V/V), ácido acético 10% (V/V)

8.1.2. Detección mediante tinción con iones plata

Luego de la corrida electroforética, el gel se lavó 3 veces con H₂O durante 5 min para eliminar el SDS remanente. Las proteínas fueron fijadas sumergiendo el gel en 50 mL de solución de fijación durante 1 h. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 10 min con solución de lavado, seguidos de una incubación de 1 min con 50 mL de solución de pretratamiento. Luego de 3 lavados de 20 seg con H₂O, el gel fue sumergido durante 20 min en solución de impregnación. A continuación, se repitieron 3 lavados de

20 seg con H₂O, y el gel fue incubado con 50 mL de solución de revelado hasta la aparición de bandas nítidas. Rápidamente, se realizó un lavado con H₂O y, finalmente, se detuvo la reacción sumergiendo el gel en 30 mL de solución de lavado. Todas las incubaciones y lavados se realizaron en agitación a TA.

Solución de fijación: metanol 50% (V/V), ácido acético 12% (V/V), formaldehído 0,05% (V/V)

Solución de lavado: etanol 50% (V/V)

Solución de pretratamiento: tiosulfato de sodio 0,02% (P/V)

Solución de impregnación: nitrato de plata 0,2% (P/V), formaldehído 0,075% (V/V)

Solución de revelado: carbonado de sodio 6% (P/V), formaldehído 0,05% (V/V), tiosulfato de sodio 0,0004% (P/V)

8.1.3. Detección inmunoquímica (*western blot*)

Luego de la electroforesis se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF (difluoruro de polivinilideno), utilizando un protocolo estándar de transferencia de proteínas (165). La transferencia se realizó en el sistema de electroforesis modular vertical Mini Protean 3 (transferencia sumergida), utilizando *buffer* de transferencia fría, a corriente constante de 180 mA durante 1 h, refrigerando el dispositivo en todo momento. Posteriormente, se bloquearon los sitios libres de la membrana mediante incubación con *buffer* de bloqueo ON a 4 °C.

Para la detección específica de las proteínas se siguieron los siguientes protocolos:

- Se incubó la membrana con el pAb de conejo anti-rbFSH, diluido 1:1500 en *buffer* diluyente, durante 1 h a TA en agitación, seguido de una incubación con un anticuerpo anti-Igs de conejo conjugado a HRP, diluido 1:2000 en la misma solución, durante 1 h a TA en agitación.
- Se incubó la membrana con el mAb P3A8 anti-hFSH β , diluido 1:500 en *buffer* diluyente, durante 1 h a TA en agitación, seguido de una incubación con un anticuerpo anti-Igs de ratón conjugado a HRP, diluido 1:2000 en la misma solución, durante 1 h a TA en agitación.

Luego de cada etapa, se realizaron tres lavados, sumergiendo la membrana de PVDF en TBS-T durante 5 min a TA con agitación. Para el revelado, se empleó el *kit* de quimioluminiscencia Pierce™ *ECL Western Blotting substrate* (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las indicaciones del fabricante. La membrana se incubó con el reactivo durante 1 min a TA, se escurrió y se colocó en un soporte de acrílico, cubriéndola con un nylon para evitar el contacto directo del sustrato con la película reveladora. Finalmente, la membrana se expuso a una película fotográfica *Amersham Hyperfilm ECL* (GE Healthcare) en un cuarto oscuro durante 1 a 5 min. El revelado de

la película fotográfica se efectuó en forma manual, empleando el método convencional de revelado y fijación.

Buffer de transferencia: Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% (V/V)

Buffer de bloqueo: leche descremada 5,0% (P/V) en TBS (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5)

Buffer diluyente: leche descremada 0,5% (P/V) en TBS-T

TBS-T: Tween-20 0,05% (V/V) en TBS

8.2. Métodos espectroscópicos

8.2.1. Espectrofotometría

La cuantificación de muestras purificadas se llevó a cabo por lectura de absorbancia a $\lambda=280$ nm en un espectrofotómetro UV-visible (Ultrospec 2000, GE Healthcare), utilizando cubetas de cristal de cuarzo. Para convertir las unidades de absorbancia en unidades de masa, se utilizaron coeficientes másicos de extinción de $0,98 \text{ L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ para rbFSH wt y $0,83 \text{ L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ para rbFSH-LD, los cuales fueron calculados mediante el servidor web ProtParam de Expasy (<https://web.expasy.org/protparam/>).

8.2.2. Espectroscopía de emisión de fluorescencia

Las mediciones espectrofluorimétricas se realizaron utilizando un espectrómetro de luminiscencia Perkin-Elmer LS-55 equipado con una lámpara de descarga de xenón, monocromadores de tipo Monk-Gillieson y un fotomultiplicador cerrado. La adquisición de datos se realizó utilizando el software FL Winlab v4.00.03, suministrado por Perkin Elmer. En todos los casos, se utilizaron células de cuarzo con paredes planas de $100 \mu\text{L}$. Se utilizó un ancho de ranura de 10 nm tanto en los monocromadores de excitación como en los de emisión. El voltaje del detector se estableció en 800 V, y la velocidad de adquisición fue de 600 nm.min^{-1} . Las muestras fueron excitadas a 275 nm y los espectros de emisión se registraron de 290 a 500 nm, en pasos de 1 nm (en estas condiciones se registran simultáneamente las contribuciones de tirosinas y triptófano). Las muestras fueron diluidas en *buffer* fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4 con o sin el agregado de urea 6 M o ditiotreitól (DTT) 100 mM, y se incubaron durante 1 h a 37°C . Adicionalmente, una muestra diluida en *buffer* fosfato fue sometida a tratamiento térmico durante 1 h a 80°C .

8.2.3. Dicroísmo circular

Las muestras fueron analizadas en un espectropolarímetro UV-Vis marca JASCO modelo J-1500. Los espectros de dicroísmo circular en UV-lejano se adquirieron entre 190 y 250 nm, correspondiente a la región de absorción de los enlaces que componen el plano peptídico, utilizando una cubeta de cuarzo de paso óptico de 1 mm. Los espectros de dicroísmo circular en UV-cercano se adquirieron entre 250 y 320 nm, correspondiente a la región de absorción de los aminoácidos aromáticos, utilizando una cubeta de cuarzo de paso óptico de 10 mm. Estos ensayos se llevaron a cabo en la Plataforma Argentina de Biología Estructural y Metabólica (PLABEM) del Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET).

8.3. Métodos para la caracterización de glúcidos

8.3.1. Isoelectroenfoque (IEF)

El análisis de las isoformas de las moléculas se realizó mediante focalización isoelectrica, utilizando el sistema *model 111 mini IEF cell* (Bio-Rad) y una fuente de poder PowerPac 3000 (Bio-Rad). La técnica de isoelectroenfoque se llevó a cabo en geles de 0,4 mm de espesor, con una concentración de acrilamida/bisacrilamida del 5% (P/V), urea 5 M, sacarosa 10% (P/V) y anfolitos 2% (P/V). Para obtener el rango de pH deseado, se empleó una mezcla de anfolitos con un rango de pI 3,5-5,5 (Bio-Lyte, Bio-rad). Una vez preparado el soporte electroforético, se sembraron 0,5-7 µL de muestra directamente sobre el mismo, a 1 cm de distancia desde el extremo superior, y se dejó reposar 10 min hasta que las muestras difundieron completamente en el gel. Posteriormente, se realizó el enfoque en condiciones de voltaje constante de forma escalonada, siguiendo las indicaciones del fabricante. Se comenzó con un voltaje de 100 V durante 15 min, se continuó a 200 V durante 15 min y, finalmente, se prosiguió a 450 V durante 90 min. Finalizada la corrida, las bandas de proteína se revelaron mediante tinción con solución CBB coloidal ON a 37 °C. Posteriormente, el gel se lavó repetidamente con H₂O para eliminar el exceso de colorante y se lo preservó en solución conservante hasta su escaneo.

Solución CBB coloidal: azul brillante de Coomassie R-250 0,025% (P/V), metanol 20% (V/V), ácido acético 5% (V/V)

Solución conservante: ácido acético 7% (V/V)

8.3.2. N- y O-deglicosilación enzimática

Para confirmar la presencia de N- y O-glicanos unidos a las diferentes proteínas, las muestras purificadas se sometieron a una reacción de deglicosilación enzimática

secuencial. Con este fin, se incubaron 3 µg de proteína con 2 µl de *buffer* de desnaturalización 10X durante 10 min a 100 °C. Posteriormente, se adicionó 1:10 de volumen de *Glycobuffer* 2 10X y 1:10 de volumen del detergente NP-40 10% (V/V), junto a 15 U de PNGasa F (New England Biolabs), y se incubó ON a 37 °C. Al día siguiente, se tomaron 800 ng de la reacción anterior, se agregó 1:10 de volumen de *Glycobuffer* 1 10X y se trató con 40 UI de α2-3,6,8,9 Neuraminidasa A (New England Biolabs) durante 1 h a 37 °C. Una vez que las proteínas estuvieron libres de ácido siálico terminal, se tomaron 400 ng y se añadió 1:10 de volumen de *Glycobuffer* 2 10X, seguido de 40.000 UI de endo-α-N-Acetilgalactosaminidasa (*O-Glycosidase*, New England Biolabs), continuando la incubación ON a 37 °C. Para verificar la eliminación de los glicanos, las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y posterior tinción con CBB, como se describió en la sección 8.1.1 de este apartado.

Buffer de desnaturalización 10X: SDS 5% (P/V), DTT 0,4 M

Glycobuffer 2 10X: fosfato de sodio 0,5 M, pH 7,5

Glycobuffer 1 10X: acetato de sodio 0,5 M, pH 5,5

8.3.3. Determinación del contenido de ácido siálico (Neu5Ac)

La cuantificación de ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) en las muestras purificadas se realizó mediante cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detección amperométrica pulsada (HPAE-PAD), empleando el sistema DIONEX ICS-5000 (Dionex, Thermo Fisher Scientific) equipado con una columna CarboPac™ PA20 (Dionex, Thermo Fisher Scientific) y una pre-columna AminoTrap™ (Dionex, Thermo Fisher Scientific). El ácido siálico fue escindido de las glicoproteínas mediante hidrólisis ácida suave en HCl 0,1 M a 80 °C durante 1 h. Luego, las muestras fueron llevadas a sequedad utilizando un concentrador de vacío (Savant SpeedVac, Thermo Fisher Scientific) y resuspendidas en H₂O ultrapura. La cromatografía se realizó a 30 °C con un flujo de trabajo de 0,5 mL.min⁻¹. Luego de la inyección automática de 100 µL de las muestras, se utilizó el perfil de elución descrito en la Tabla 6.

Tabla 6. Gradiente utilizado para análisis de Neu5Ac

Tiempo (min)	% fase móvil A	% fase móvil B
0	90	10
4	90	10
14	50	50
17	50	50
18	10	90

Fase móvil A: NaOH 100 mM

Fase móvil B: Acetato de sodio 500 mM, NaOH 100 mM

Para la identificación y cuantificación de los picos obtenidos, se utilizó un estándar de Neu5Ac (Calbiochem) al cual se le realizó el mismo tratamiento que a las muestras. La integración del pico correspondiente al analito de interés se realizó mediante el software Chromeleon v6.8 (Thermo Fisher Scientific).

8.4. Desarrollo de una técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Con el objetivo de contar con una metodología robusta que permita determinar pureza, identidad y estabilidad de las hormonas recombinantes, se evaluaron dos metodologías de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *High-performance liquid chromatography*): una cromatografía en fase reversa (RP-HPLC, *reverse phase-HPLC*) y una cromatografía de exclusión molecular (SEC-HPLC, *size exclusion chromatography-HPLC*).

8.4.1. Cromatografía en fase reversa (RP-HPLC)

Para el desarrollo de la técnica, se utilizó una columna Jupiter C4 (4,6 x 250 mm; 5 µm; 300Å; Phenomenex) y una pre-columna Widespore C4 (3 x 40 mm, Phenomenex). La cromatografía se realizó a 25 °C, empleando un flujo de 1 mL.min⁻¹, en un equipo HPLC analítico (Nexera Inert, Shimadzu), acoplado a un detector de arreglo de diodos (DAD). La elución se logró empleando un gradiente lineal (10% B a 45% B en 20 min).

Fase móvil A: Buffer fosfato de sodio 50 mM; pH 7,4

Fase móvil B: Acetonitrilo (ACN)

8.4.2. Cromatografía de exclusión molecular (SEC-HPLC)

Para el desarrollo de la técnica, se utilizó una columna Yarra SEC3000 (7,8 x 300 mm; 3 µm; Phenomenex). La cromatografía se realizó a TA, en un equipo HPLC analítico (Waters), acoplado a un detector UV-vis. Para hallar la mejor condición para el análisis de las moléculas, se evaluaron dos fases móviles diferentes (según se detalla en la Tabla 7). En todos los casos, la elución se realizó de forma isocrática con la correspondiente fase móvil.

Tabla 7. Condiciones utilizadas en SEC-HPLC

Experimento	Composición de la fase móvil	Flujo (mL.min ⁻¹)
SEC-I	Fosfato de sodio 50 mM; sulfato de sodio 50 mM; NaCl 100 mM; pH 6,0	0,8
SEC-II	Fosfato de sodio 50 mM; arginina-HCl 200 mM; pH 7,0	0,8

9. Caracterización biológica de las variantes de rbFSH

9.1. Evaluación de los parámetros farmacocinéticos de las variantes de rbFSH en animales de experimentación utilizando la vía subcutánea

Con el propósito de evaluar la influencia de la porción glicosídica sobre los parámetros farmacocinéticos de las variantes de rbFSH, se realizaron experimentos *in vivo* utilizando animales de experimentación. Los estudios se llevaron a cabo empleando la vía subcutánea. Para ello, se emplearon ratas Wistar hembras, de dos meses de edad, con un peso promedio de 200 g (Centro de Medicina Comparada, ICiVet-Litoral, CONICET-UNL, Argentina), las cuales fueron mantenidas en un bioterio a una temperatura controlada de 24 °C y un fotoperíodo luz/oscuridad de 12 h, proporcionándoles agua y comida *ad libitum*. Las ratas fueron separadas en lotes de ocho animales cada uno e inyectadas por vía subcutánea con una dosis única de 50 µg de cada variante de rbFSH. Con el objetivo de minimizar los efectos adversos derivados de múltiples extracciones de sangre, y en cumplimiento de las normas éticas que regulan el volumen diario máximo de extracción de sangre permitido, los animales de cada grupo fueron divididos en dos subgrupos de 4 ratas cada uno, los cuales se emplearon para la extracción de sangre a tiempos alternados. Las muestras de sangre se tomaron en un lapso de 96 y 168 h para el grupo rbFSH y rbFSH-LD, respectivamente. Posteriormente, se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min a TA y el plasma fue separado y conservado a -20 °C para su posterior análisis. La cuantificación de cada variante en el plasma se realizó mediante sELISA (sección 7.3). El modelado de los datos se realizó mediante el *software* de modelado no lineal de efectos mixtos (NLME, *nonlinear mixed-effects model*) Monolix 2023R1 (Lixoft), aplicándose dos modelos diferentes para cada hormona, los cuales se describen a continuación (secciones 9.1.1 y 9.1.2 de este apartado).

9.1.1. Modelo de un compartimento con cinética de absorción y eliminación de primer orden

Este tipo de modelo se ajusta de manera adecuada al comportamiento de fármacos administrados en solución acuosa por vía oral, intramuscular o subcutánea

(166). El modelo asume que, si la distribución de un fármaco es instantánea, tanto la velocidad global de absorción como la velocidad de eliminación, se pueden describir como procesos de primer orden. Además, el modelo describe la distribución del fármaco en un único compartimento principal compuesto de tejidos corporales cinéticamente indistinguibles y su eliminación a partir del mismo. En el caso de una droga administrada en forma oral, la tasa de cambio en la cantidad de fármaco en el cuerpo en un momento dado depende de las velocidades relativas de absorción y eliminación del fármaco. Esto se ilustra en la (Figura 13), donde D_{GI} es la cantidad de fármaco en el tracto gastrointestinal, D_E es la cantidad de fármaco eliminado, D_B es la cantidad de fármaco en el cuerpo, V_D es el volumen aparente de distribución, k_a es la constante de velocidad de absorción de primer orden y k es la constante de eliminación de primer orden.

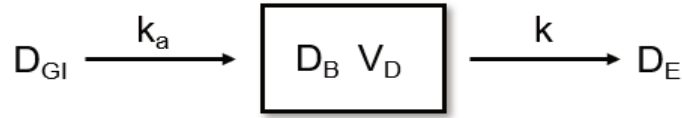


Figura 13. Modelo de un compartimento con absorción y eliminación de primer orden.

La velocidad de desaparición de la droga en el tracto gastrointestinal (GI), que en valor absoluto representa la velocidad de absorción por el organismo, se describe como:

$$\frac{dD_{GI}}{dt} = -F \cdot D_{GI} \cdot k_a \quad (16)$$

donde F es la fracción de fármaco absorbida. La velocidad de eliminación de la droga del organismo se puede expresar como $-kD_B$. La proporción de cambio de la cantidad de droga en el organismo es la diferencia entre la velocidad de captación (absorción) y la de salida (eliminación), por lo que:

$$\frac{dD_B}{dt} = F \cdot D_{GI} \cdot k_a - k \cdot D_B \quad (17)$$

integrando la ecuación anterior y reordenando, se obtiene la ecuación general que describe la variación de la concentración de una droga en plasma (C_p) a cualquier tiempo t luego de su administración extravascular:

$$C_p = \frac{F \cdot k_a \cdot D_0}{V_D \cdot (k_a - k)} (e^{-k \cdot t} - e^{-k_a \cdot t}) \quad (18)$$

En la Figura 14 se muestra un perfil típico de la concentración de una droga en el cuerpo luego de una única dosis extravascular. La máxima concentración plasmática

luego de la administración se denomina $C_{m\acute{a}x}$ y el tiempo necesario para alcanzar dicha concentración, $t_{m\acute{a}x}$, el cual es independiente de la dosis y depende de las constantes de absorción (k_a) y de eliminación (k). Cuando se produce la $C_{m\acute{a}x}$, la velocidad de absorción iguala a la velocidad de eliminación, por lo que el cambio de la concentración de la droga en plasma es igual a cero. La tasa de cambio de la concentración de la droga a $C_{m\acute{a}x}$ puede obtenerse diferenciando la ecuación (18):

$$\frac{dC_p}{dt} = \frac{F \cdot k_a \cdot D_0}{V_D \cdot (k_a - k)} (-k \cdot e^{-k \cdot t} - k_a \cdot e^{-k_a \cdot t}) = 0 \quad (19)$$

la cual, puede simplificarse como:

$$k \cdot e^{-k \cdot t} = k_a \cdot e^{-k_a \cdot t} \quad (20)$$

aplicando logaritmos, se obtiene una ecuación para la determinación de $t_{m\acute{a}x}$ (valor que luego se utiliza para el cálculo de $C_{m\acute{a}x}$),

$$t_{m\acute{a}x} = \frac{2.3 \cdot \log \cdot \left(\frac{k_a}{k}\right)}{k_a - k} \quad (21)$$

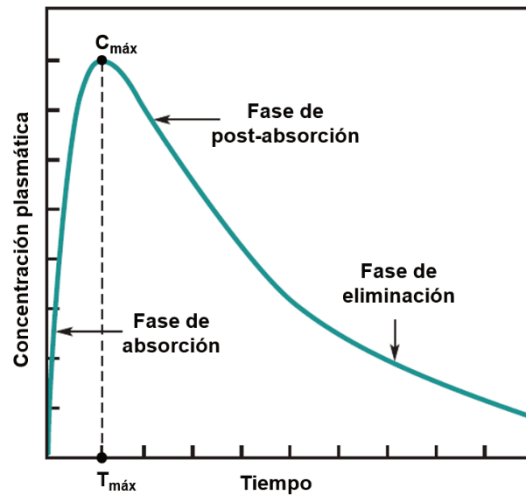


Figura 14. Perfil plasmático de una droga inyectada mediante una vía extravascular. Se indican las fases de absorción y de eliminación de la misma. Figura adaptada de Shargel y Yu, 2016 (167).

El tiempo de vida media de eliminación ($t_{1/2,elim}$), se puede obtener a partir de la siguiente expresión:

$$t_{1/2,elim} = \frac{0,693}{k} \quad (22)$$

Este parámetro hace referencia al tiempo transcurrido hasta que la concentración plasmática de la droga se reduce a la mitad.

Otro parámetro importante que describe a una droga en un sistema dado es su velocidad de eliminación del organismo o *clearance*. El *clearance* es un término farmacocinético que describe la eliminación de fármacos del organismo sin identificar el mecanismo del proceso, considera a todo el organismo como un único sistema de eliminación de fármacos del que pueden producirse muchos procesos de eliminación no identificados. El *clearance* considera que la droga se encuentra uniformemente disuelta en un volumen de fluido (volumen aparente de distribución, V_D), a partir del cual, la concentración de la droga puede medirse fácilmente. Típicamente, el *clearance* se define como el volumen fijo de líquido (que contiene el fármaco) eliminado del organismo por unidad de tiempo. Alternativamente, el *clearance* puede definirse como la velocidad de eliminación de una droga dividido por su concentración en plasma.

$$Cl = \frac{\frac{dD_E}{dt}}{C_p} \quad (23)$$

Reordenando la ecuación anterior se tiene:

$$Velocidad\ de\ eliminación = \frac{dD_E}{dt} = C_p \cdot Cl \quad (24)$$

Para drogas que siguen una cinética de eliminación de primer orden, la velocidad de eliminación de la droga depende de la cantidad de droga remanente en el cuerpo.

$$\frac{dD_E}{dt} = k \cdot D_B = k \cdot C_p \cdot V_D \quad (25)$$

Sustituyendo la velocidad de eliminación de la ecuación (24) por kC_pV_D de la ecuación (25) y, reordenando, se obtiene:

$$Cl = \frac{k \cdot C_p \cdot V_D}{C_p} = k \cdot V_D \quad (26)$$

La ecuación anterior muestra que el *clearance* es el producto entre dos constantes, V_D y k . El volumen aparente de distribución, V_D , no es un verdadero volumen fisiológico. Muchas drogas tienen un volumen de distribución menor o igual a la masa corporal. Para otras drogas, el volumen de distribución puede ser varias veces superior a la masa corporal. Las drogas con un V_D grande se encuentran concentradas predominantemente en tejidos extravasculares. Si la droga se encuentra fuertemente

unida a proteínas plasmáticas o permanece en la región vascular, su concentración en plasma será mayor, resultando en un menor volumen aparente de distribución.

9.1.2. Modelo de un compartimento con compartimentos de tránsito y cinética de absorción y eliminación de primer orden

Después de la administración de un fármaco por vía extravascular, transcurre un tiempo antes de que el fármaco aparezca en la circulación sistémica. Este tiempo refleja el tiempo necesario para (i) la desintegración del sistema de administración, (ii) la disolución y/o liberación del fármaco del sistema de administración, (iii) el tránsito hacia el sitio o sitios de absorción, (iv) la migración de las moléculas del fármaco hacia la superficie de absorción y/o (v) la transferencia del fármaco a través del tejido en el sitio de absorción. Debido a estos procesos, la aparición del fármaco en la circulación se retrasa y este fenómeno se conoce como retraso en la absorción (*absorption delay*). Aunque el retraso en la absorción de fármacos es un fenómeno complejo, el enfoque estándar para describir este fenómeno en el análisis farmacocinético es bastante simple: introducir un parámetro de tiempo de retraso (t_{lag} *lag time*). El t_{lag} retrasa el momento de la dosificación como si el medicamento se hubiera administrado en un momento posterior. Generalmente, esto ayuda a describir los perfiles de absorción retardada con mayor precisión; sin embargo, en algunos casos, estos modelos pueden describir dicha fase de absorción deficientemente. En estos casos, se puede mejorar la descripción de la fisiología subyacente, así como el impacto de la formulación del fármaco y las propiedades fisicoquímicas del fármaco en sí en el proceso de absorción, modelando la absorción como un proceso de múltiples pasos (168).

Se han desarrollado modelos farmacocinéticos (PK, *pharmacokinetics*) de absorción basados en la fisiología que tienen en cuenta las propiedades fisicoquímicas del fármaco, como la velocidad de disolución o la dependencia de la solubilidad con el pH, así como los complejos procesos fisiológicos implicados en la absorción, el metabolismo en el intestino o el hígado y el tránsito del fármaco hasta la superficie de absorción. Estos modelos mecanicistas requieren un amplio conocimiento previo, como información sobre el área de superficie de absorción, la concentración del fármaco en el lumen, la abundancia de enzimas en la pared gastrointestinal y el hígado, el flujo sanguíneo hepático, etc. Esta información no suele estar disponible, lo que impide la aplicación rutinaria de modelos fisiológicos en la estimación de la absorción de fármacos (168).

Los modelos de absorción de compartimentos de tránsito cumplen este requisito, al describir la absorción del fármaco como un proceso de múltiples pasos representado

por una cadena de compartimentos presistémicos, sin asignar un correlato físico a cada compartimento de tránsito (Figura 15) (168).

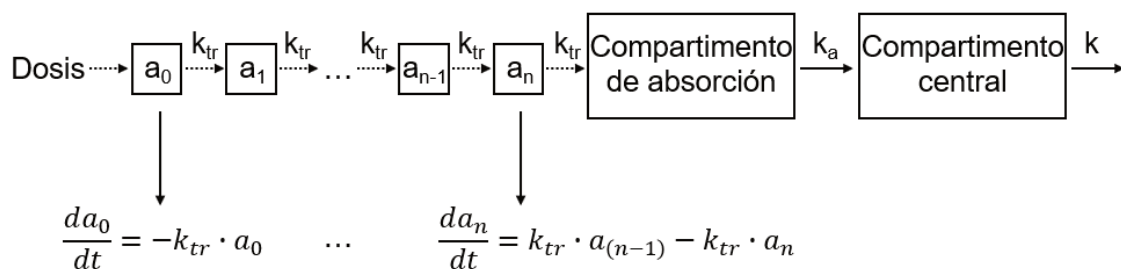


Figura 15. Modelo de absorción con compartimentos de tránsito con un compartimento central, y con absorción y eliminación de primer orden. Figura adaptada de Savic y col., 2007 (168).

Este modelo describe el retraso de la absorción por el paso del fármaco a través de una serie de compartimentos de tránsito con una única constante de velocidad de transferencia, k_{tr} . La tasa de cambio de la cantidad de fármaco en el compartimento n está dada por:

$$\frac{da_n}{dt} = k_{tr} \cdot a_{n-1} - k_{tr} \cdot a_n \quad (27)$$

donde da_n/dt representa la tasa de cambio de la sustancia a en el compartimento n en el tiempo t , a_n es la cantidad de fármaco en el compartimento n en el tiempo t , k_{tr} representa una constante de velocidad de tránsito desde el compartimento $n-1$ al compartimento n y n es el número de compartimentos de tránsito.

La solución analítica para a_n viene dada por la función:

$$a_n = F \cdot D_0 \cdot \frac{(k_{tr} \cdot t)^n}{n!} \cdot e^{-k_{tr} \cdot t} \quad (28)$$

Donde $n!$ es la función factorial de n . Para computar numéricamente esta función, se utiliza la aproximación de Stirling:

$$n! \approx \sqrt{2\pi} \cdot n^{n+0,5} \cdot e^{-k_{tr} \cdot t} \quad (29)$$

De esta manera, el fármaco es transferido desde el último compartimento de tránsito al compartimento central a través de un compartimento de absorción, en el cual la desaparición de la droga se describe a través de la constante de velocidad k_a . La tasa de cambio de la concentración del fármaco en el compartimento de absorción (da_a/dt) está dada por:

$$\frac{dA_a}{dt} = F \cdot D_0 \cdot k_{tr} \cdot \frac{(k_{tr} \cdot t)^n \cdot e^{-k_{tr} \cdot t}}{\sqrt{2\pi} \cdot n^{n+0,5} \cdot e^{-n}} - k_a \cdot A_a \quad (30)$$

Dada la complejidad matemática de la ecuación diferencial anterior, la solución a la misma es aproximada por el *software* mediante un método de integración numérica (por ej., el método BDF, *backward differentiation formula*) y, por lo tanto, no se cuenta con una expresión matemática para A_a .

La proporción de cambio de la cantidad de droga en el organismo es la diferencia entre la velocidad de captación (absorción) y la de salida (eliminación), por lo que:

$$\frac{dD_B}{dt} = k_a \cdot A_a - k \cdot D_B \quad (31)$$

De forma similar a la ecuación (30), la solución a la ecuación (31) es aproximada por el *software* mediante un método de integración numérica.

Debido a la falta de una solución analítica que describa la concentración del fármaco en plasma, la estimación de $C_{m\acute{a}x}$ y $t_{m\acute{a}x}$ se llevó a cabo mediante un método de aproximación numérica. Para ello, se calcularon múltiples valores de concentración en plasma en intervalos de tiempo muy pequeños (dt), centrados en el rango cercano al valor máximo observado en la gráfica de concentración en función del tiempo. Este enfoque permitió identificar el punto máximo con mayor precisión al evaluar la curva en intervalos muy finos alrededor del máximo estimado. El $t_{1/2,elim}$ y el CI se calcularon con las ecuaciones (22) y (26), respectivamente.

Un parámetro útil en el modelo con compartimentos de tránsito es el tiempo medio de tránsito (MTT), que representa el tiempo promedio que tardan las moléculas del fármaco en viajar desde el primer compartimento de tránsito hasta el compartimento de absorción. La relación entre MTT, n y k_{tr} se muestra en la siguiente ecuación:

$$k_{tr} = \frac{n + 1}{MTT} \quad (32)$$

9.1.3. Estimación de los parámetros poblacionales, individuales y evaluación de la calidad de los modelos

Para la estimación de los parámetros poblacionales se utilizó el estimador de máxima verosimilitud de los parámetros de la población, sin ninguna aproximación del modelo (es decir, sin linealización) utilizando el algoritmo *stochastic approximation expectation maximization* (SAEM). Los errores estándar se calcularon mediante la estimación de la Matriz de Información de Fisher (FIM) mediante aproximación estocástica. La media condicional de los parámetros individuales se calculó mediante

un muestreo de la distribución condicional utilizando un procedimiento de Montecarlo basado en cadenas de Markov (MCMC). La calidad de los diferentes modelos obtenidos se evaluó utilizando los ajustes individuales, los gráficos de observaciones *versus* predicciones, la verosimilitud logarítmica, el criterio de información de Akaike (AIC), el criterio de información bayesiano (BIC) y el criterio de información bayesiano corregido (BICc).

9.2. Valoración de la actividad biológica de las variantes de rbFSH en animales de experimentación

La potencia de las variantes de rbFSH fue evaluada en ratas hembra de la cepa Wistar/Cmedc mediante el ensayo recomendado por la Farmacopea Europea y descrito originalmente por Steelman y Pohley (169). Para tal fin, 15 ratas por grupo de tratamiento fueron divididas en 3 subgrupos de 5 ratas cada uno, a los que se administraron 3 dosis diferentes de cada hormona (1,5; 3,0 y 6,0 UI por animal), en combinación con 28 UI.mL⁻¹ de hCG, con el objetivo de asegurar la completa luteinización de los ovarios. La dosis total de cada hormona fue resuspendida en 1,5 mL y administrada en 3 dosis a las 0, 24 y 48 h. Aproximadamente 24 h después de la última administración, los animales fueron sacrificados y se procedió a la extirpación y pesaje de los ovarios. El peso de los ovarios de las ratas tratadas con las hormonas recombinantes fue comparado con el peso de los ovarios de ratas tratadas con un estándar internacional de FSH humana recombinante (NIBSC 92/510). Estos ensayos se llevaron a cabo en el Centro de Medicina Comparada (CMC, Esperanza, Santa Fe).

9.3. Evaluación de la actividad biológica de las variantes de rbFSH en ganado bovino

El presente estudio incluyó 15 vacas destetadas, cruza de *Bos indicus*, mantenidas en un corral con pastura de alfalfa y suplementadas con rollos de heno. El puntaje de condición corporal promedio de los animales fue de $3,25 \pm 0,26$ (escala de 1 a 5). Solo se consideraron vacas ciclando con un tracto uterino sano. En el día 0 del estudio, se escanearon los ovarios de las vacas y se realizó el recuento de folículos antrales (AFC; folículos ≥ 3 mm), seguido de la inserción de un dispositivo intravaginal con 1,2 g de progesterona (CEVA) y la administración de una inyección de 2 mg de benzoato de estradiol (CEVA) y 5 mg de progesterona (CEVA). El día 4, las vacas se dividieron aleatoriamente en 3 grupos equilibrados en función de su AFC, de la siguiente manera:

- Grupo control: las vacas no recibieron ningún tratamiento con FSH.
- Grupo rbFSH-LD: las vacas recibieron 180 µg de rbFSH-LD.

- Grupo rbFSH: las vacas recibieron una dosis total de 180 µg de rbFSH, de acuerdo con la secuencia que se detalla en la Tabla 8.

Tabla 8. Esquema de aplicación de rbFSH

	Momento de aplicación	
	am	pm
Día 4	36 µg	36 µg
Día 5	27 µg	27 µg
Día 6	18 µg	18 µg
Día 7	9 µg	9 µg

El día 6, todas las vacas recibieron dos dosis de 150 µg de D-Cloprostenol administradas con 12 h de diferencia. El día 7 por la tarde, se retiraron los dispositivos intravaginales de P4 y se aplicó pintura para detección de celo en la base de la cola. En la mañana del día 8, se administraron 20 µg de acetato de buserelina (CEVA) y se escanearon los ovarios para contar los folículos grandes (≥ 8 mm). En la tarde del día 8, todas las vacas fueron inseminadas a tiempo fijo (IATF), y 12 h después recibieron una segunda inseminación. Se utilizó semen de un toro de fertilidad comprobada. En la mañana del día 15, se realizó un lavado uterino no quirúrgico a todas las vacas para recolectar embriones, los cuales fueron clasificados de acuerdo con las directrices de la IETS (*International Embryo Technology Society*). Estos ensayos fueron realizados por los médicos veterinarios Gabriel Bó (Instituto de Reproducción Animal Córdoba, IRAC) y Luciano Cattaneo (Facultad de Ciencias Veterinarias, FCV-UNL).

10. Análisis de datos

Para el análisis de datos se utilizaron las siguientes librerías de Python: Matplotlib (170), Numpy (171), Pandas (172), Pingouin (173), Plotly (174), Scipy (175) and Statsmodels (176). Se utilizó la prueba t para comparar 2 muestras entre sí, mientras que la comparación entre grupos se realizó mediante ANOVA, en el caso de cumplirse los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza; para verificar estos supuestos, se utilizaron las pruebas de Shapiro-Wilks y Levene, respectivamente. Para determinar cuáles medias son significativamente diferentes entre sí (comparación múltiple) se aplicó el método de Tukey. Para los casos donde no se cumplieron los supuestos de normalidad y/o homogeneidad de varianzas, se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. En este caso, para comparación múltiple de muestras, se utilizó la prueba de Dunn. En todos los casos, se consideró la existencia de diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Desarrollo de metodologías analíticas para la caracterización y cuantificación de variantes de rbFSH

Para el desarrollo de un nuevo proceso de producción, en este caso, de rbFSH, es necesario contar con metodologías analíticas que permitan el seguimiento tanto de la concentración como de la calidad de las hormonas en sus diferentes etapas. Con este fin, se desarrollaron diversas técnicas analíticas de identificación, detección y cuantificación de las variantes de rbFSH. Es importante destacar que estas metodologías fueron desarrolladas en forma simultánea y/o posterior a la generación de las líneas celulares productoras de las hormonas y el desarrollo de los métodos de purificación de las mismas, resultados que se describen en las secciones 2 y 3 de este apartado.

1.1. Obtención de anticuerpos policlonales anti-rbFSH

Con el objetivo de contar con anticuerpos policlonales que reconozcan de manera específica a las variantes de rbFSH, se llevó a cabo un plan de inmunización en conejo con repetidas dosis de rbFSH purificada (pureza >99%), obteniéndose 25 mL de sangre.

Para evaluar el título de pAb presentes en el suero, se realizó un ELISA específico indirecto (Figura 16). Se obtuvo un título superior a 1:409.600, lo cual indica la presencia de anticuerpos anti-rbFSH en el suero del animal inmunizado. Este título se consideró adecuado para su aplicación tanto en ensayos de inmunodetección por *western blot* como en el desarrollo de un ELISA sándwich.

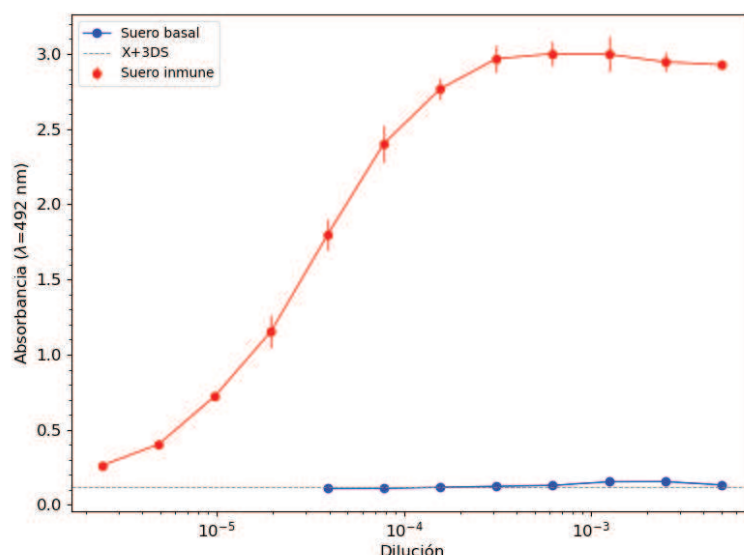


Figura 16. Titulación del pAb anti-rbFSH en suero de conejo mediante ELISA indirecto. (●) Suero inmune anti-rbFSH. (●) Suero basal de conejo. El título se calculó como la máxima dilución de la muestra cuyo valor de absorbancia superó al valor del blanco más tres desviaciones estándar (línea discontinua).

1.2. Producción de anticuerpos monoclonales anti-hFSHβ

Con el objetivo de obtener anticuerpos monoclonales destinados al desarrollo de un ELISA sándwich (sELISA), se llevó a cabo, en primer lugar, un cultivo del hibridoma P3A8 en condiciones de adherencia y, posteriormente, su purificación a partir del SN de cultivo mediante cromatografía de afinidad a proteína A. La Figura 17A muestra un cromatograma obtenido durante la purificación del mAb, la cual fue monitoreada por espectrofotometría a $\lambda = 280$ nm.

Una vez finalizado el procedimiento, se mezclaron las fracciones correspondientes al pico de elución y se evaluó la pureza mediante SDS-PAGE seguido de tinción por CBB (Figura 17B). En las fracciones correspondientes a la elución del anticuerpo (carriles 5 a 8) se visualizaron dos bandas mayoritarias correspondientes a las cadenas pesada (50 kDa) y liviana (25-33 kDa) de las inmunoglobulinas (Igs). Además, se detectó albúmina sérica bovina (ASB) en pequeñas cantidades, así como también dos bandas de elevada masa molecular, que constituyeron los principales contaminantes. El grado de pureza obtenido (aproximadamente 97%) se consideró adecuado para la utilización de dichos anticuerpos en la puesta a punto de los ensayos de ELISA para la cuantificación de rbFSH.

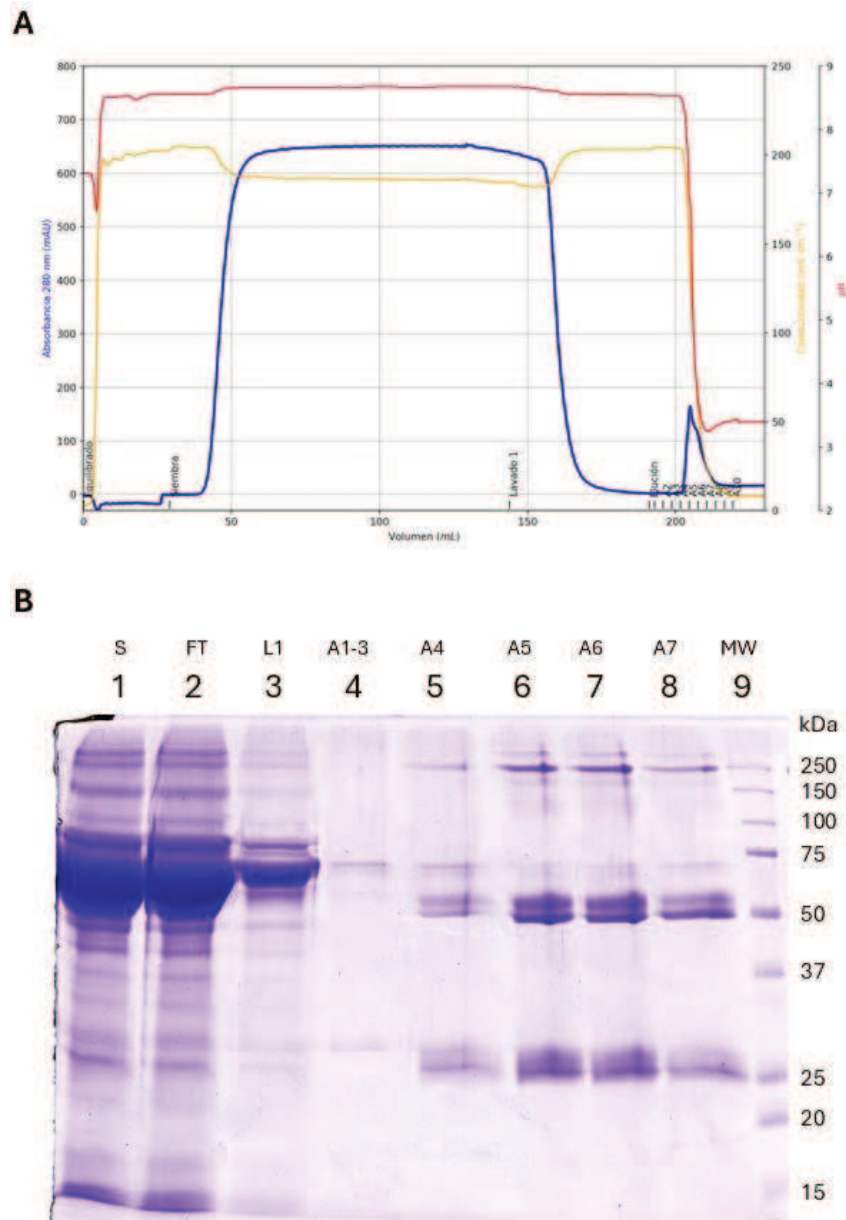


Figura 17. Purificación del mAb P3A8 anti-hFSH β mediante cromatografía de afinidad a proteína A. (A) Cromatograma representativo de la purificación. Se muestran las señales de absorbancia a $\lambda = 280$ nm (azul), conductividad (amarillo) y pH (rojo), en función del volumen de elución. Se indican las diferentes etapas del proceso: equilibrado, siembra, lavados y elución. (B) Análisis de las fracciones obtenidas durante la purificación mediante SDS-PAGE seguido por tinción con CBB. Carril 1: Siembra (S). Carril 2: Flow-through (FT). Carril 3: Lavado (L1). Carril 4: Fracciones de elución A1-A3 (A1-3). Carril 5: Fracción de elución A4. Carril 6: Fracción de elución A5. Carril 7: Fracción de elución A6. Carril 8: Fracción de elución A7. Carril 9: Marcador de masa molecular *Precision Plus Protein™ All Blue* (MW).

1.3. Desarrollo de un sELISA para la cuantificación de variantes de rbFSH

1.3.1. Optimización de un sELISA para la cuantificación de variantes de rbFSH mediante diseño experimental (DoE)

Se diseñó un ensayo de ELISA sándwich destinado a la cuantificación de rbFSH. El sistema consistió en la inmovilización del mAb anti-hFSH β , previamente purificado mediante cromatografía de afinidad a proteína A, para la captura específica de la hormona en fase sólida. La detección se realizó mediante incubación con el suero de conejo conteniendo el pAb anti-rbFSH, cuya presencia se reveló mediante incubación con un anticuerpo de cabra anti-Igs de conejo conjugado a la enzima peroxidasa (conjugado-HRP), que cataliza la conversión de un sustrato incoloro en una sustancia coloreada.

Para la optimización del método, se decidió emplear exclusivamente la nueva variante de rbFSH desarrollada, rbFSH-LD (variante de larga duración), debido a que el ensayo para su cuantificación presenta menor sensibilidad (SEN) y mayores límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ). Esta elección se fundamentó en resultados preliminares que indicaron que las condiciones optimizadas para esta variante serían predictivas de un desempeño adecuado también para la variante rbFSH.

La optimización de las condiciones del ensayo se llevó a cabo mediante RSM, partiendo de un diseño experimental de tipo BBD. Los 17 experimentos sugeridos por este diseño, junto a las respuestas obtenidas para cada uno de ellos, se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9. Diseño experimental de tipo BBD para la optimización del sELISA

Ensayo	Factores			Respuestas		
	A: mAb (ng por pozo)	B: pAb (dil)	C: Conjugado- HRP (dil)	SEN (Abs. mL.ng ⁻¹)	LOD (ng.mL ⁻¹)	LOQ (ng.mL ⁻¹)
1	50	1:5000	1:1667	1,20	1,30	2,10
2	200	1:5000	1:1667	1,90	1,30	2,00
3	50	1:2000	1:1667	1,40	1,40	2,30
4	200	1:2000	1:1667	2,30	1,30	1,80
5	50	1:2857	1:5000	0,53	1,50	3,00
6	200	1:2857	1:5000	1,10	1,10	1,40
7	50	1:2857	1:1000	1,80	1,20	1,60
8	200	1:2857	1:1000	2,70	1,40	2,00
9	125	1:5000	1:5000	0,95	1,30	1,90
10	125	1:2000	1:5000	1,00	1,40	2,40
11	125	1:5000	1:1000	2,10	1,40	2,20
12	125	1:2000	1:1000	1,40	1,60	3,50
13	125	1:2857	1:1667	1,60	1,80	4,50
14	125	1:2857	1:1667	1,50	1,30	2,10
15	125	1:2857	1:1667	2,00	1,20	1,50
16	125	1:2857	1:1667	2,10	1,40	2,20
17	125	1:2857	1:1667	2,10	1,20	1,60
Control	200	1:4000	1:1000	2,70	1,30	2,00

Estos datos se utilizaron para modelar estadísticamente la relación entre los factores y las respuestas estudiadas mediante una estrategia de regresión múltiple. En primer lugar, las respuestas evaluadas se ajustaron a un modelo cuadrático de tipo jerárquico. Posteriormente, se estimaron los coeficientes del modelo mediante regresión múltiple con eliminación hacia atrás (del inglés *backward elimination*) y se validaron utilizando el método ANOVA ($p < 0,1$). En la Tabla 10 se resumen los resultados del ANOVA para el modelado de cada respuesta. En particular, la SEN ajustó a un modelo cuadrático, mientras que tanto el LOD como el LOQ ajustaron a un modelo lineal con interacción.

Tabla 10. Modelado de las respuestas experimentales mediante RSM

Respuesta	Modelo	Coeficientes (p-valor)	p-valor del ANOVA		R ²	R ² -adj
			Modelo	Falta de ajuste		
SEN	Cuadrático	A (0,0023)	< 0,0001	0,5724	0,8094	0,7654
		C (<0,0001)				
		C ² (0,019)				
LOD	Lineal con interacción	A (0,13)	0,0063	0,9538	0,6597	0,5669
		C (0,73)				
		AC (0,0012)				
LOQ	Lineal con interacción	A (0,034)	0,0120	0,9172	0,7605	0,6274
		B (0,74)				
		C (0,10)				
		AB (0,0028)				
		AC (0,084)				

Una vez obtenidos los modelos, se procedió a realizar una optimización simultánea de las tres respuestas, implementando la función deseabilidad (D). Los criterios de optimización de dicha función fueron maximizar la SEN, minimizar los límites (LOD y LOQ), y reducir al mínimo el uso del conjugado-HRP. En la Figura 18 se presentan las superficies de respuesta para la deseabilidad (D), SEN, LOD y LOQ, respectivamente, como función de la dilución del anticuerpo de detección (factor B) y del conjugado-HRP (factor C), manteniéndose constante el valor del mAb de captura (factor A). Se puede observar que la SEN aumenta con el uso de mayores concentraciones del conjugado-HRP, independientemente de la dilución del pAb. La respuesta muestra un comportamiento parabólico, tendiendo a un máximo, como resultado del término cuadrático en C. En el caso del LOD, la respuesta disminuye al incrementar la dilución del conjugado-HRP, nuevamente de forma independiente de la dilución del pAb. Finalmente, el LOQ tiende a minimizarse a mayor dilución tanto del pAb como del conjugado-HRP. Para la solución óptima de deseabilidad obtenida ($D = 0,7$), los valores de los factores predichos por el modelo fueron: 200 ng por pozo para el mAb captura, dilución 1:5000 para el pAb y dilución 1:2700 para el conjugado-HRP. Bajo dichas condiciones, los valores predichos por el modelo fueron: 1,7 Abs.mL.ng⁻¹ para la SEN, 1,2 ng.mL⁻¹ para el LOD y 1,5 ng.mL⁻¹ para el LOQ. De esta manera, la solución hallada representa un compromiso entre la maximización de la SEN y la minimización de ambos límites (LOD y LOQ), utilizando además la menor cantidad posible del anticuerpo conjugado.

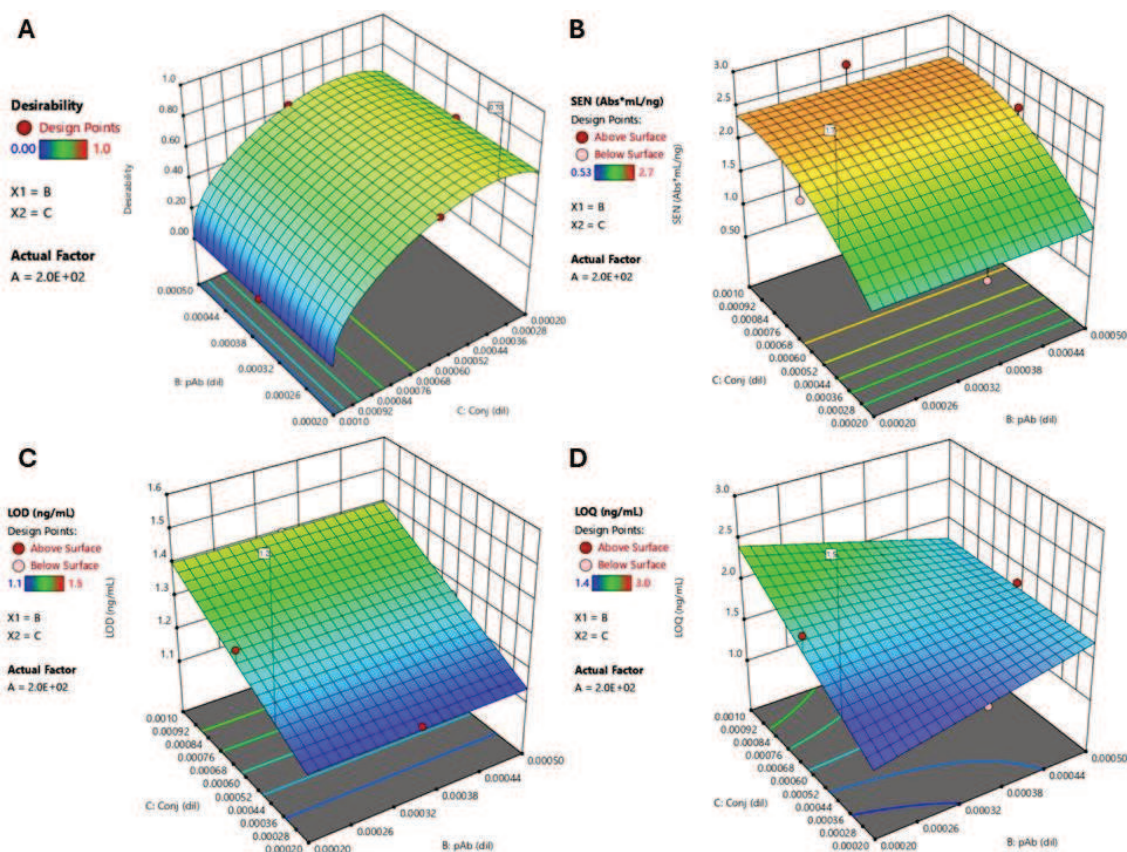


Figura 18. Superficies de respuesta obtenidas luego de la optimización del sELISA. (A) Función deseabilidad (D). (B) Sensibilidad (SEN). (C) Límite de detección (LOD). (D) Límite de cuantificación (LOQ). En cada caso, se graficaron las superficies en función de la dilución del anticuerpo de detección (factor B: pAb) y del conjugado-HRP (factor C: Conj) para una concentración fija del mAb de captura (Factor A: 200 ng por pozo).

1.3.2. Validación de las condiciones óptimas del sELISA para la cuantificación de ambas variantes de rbFSH

La validación de un método bioanalítico es el proceso que se utiliza para determinar si un método analítico optimizado es adecuado para el análisis de las muestras en estudio. Esta etapa incluye todos los procedimientos que demuestran que un método particular utilizado para la medición cuantitativa de analitos en una matriz biológica determinada es fiable y reproducible para el uso propuesto (177). Entre los parámetros analíticos que deben evaluarse durante la validación del método se incluyen: SEN, LOD y LOQ, rango lineal, precisión y exactitud (selectividad), de acuerdo con lo establecido por la Guía de Validación de Métodos analíticos para la Industria, establecida por el ICH (162).

1.3.2.1. Cifras de mérito

La validación de las cifras de mérito del ensayo para ambas hormonas se llevó a cabo mediante al menos 3 ensayos independientes, utilizando las condiciones optimizadas determinadas en la sección 1.3.1. En la Tabla 11 se resumen los principales

parámetros analíticos obtenidos para ambas variantes de la hormona. Como puede observarse, las cifras de mérito obtenidas en la etapa de validación son similares a las predichas por el modelo en la etapa de optimización. Además, si bien la optimización de las respuestas se llevó a cabo utilizando la variante rbFSH-LD, se obtuvieron resultados similares para la variante rbFSH, lo que respalda la aplicabilidad general del método.

Tabla 11. Promedio y desvío estándar de las cifras de mérito determinadas a partir de tres ensayos independientes

Cifras de mérito	rbFSH	rbFSH-LD
SEN (Abs.mL.ng⁻¹)	1,7 ± 0,1	1,6 ± 0,1
LOD (ng.mL⁻¹)	1,2 ± 0,1	1,2 ± 0,1
LOQ (ng.mL⁻¹)	1,7 ± 0,5	1,5 ± 0,3
Rango lineal* (ng.mL⁻¹)	1,7 – 10,0	1,5 – 16,0

* Rango lineal donde la prueba F es válida (p-valor>0,05)

Por otro lado, en la Figura 19 se muestran curvas dosis-respuesta típicas para ambas hormonas en las condiciones optimizadas.

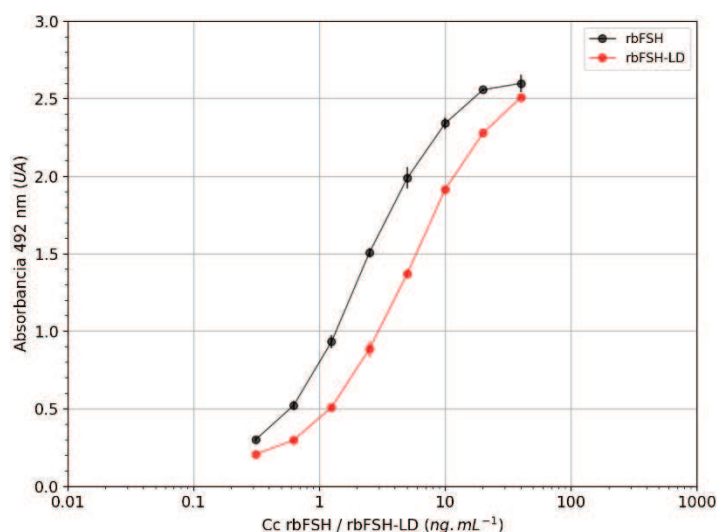


Figura 19. Curvas dosis-respuesta representativas de rbFSH y rbFSH-LD obtenidas en el sELISA optimizado. Cada punto corresponde al promedio ± desviación estándar de dos réplicas independientes por concentración de cada hormona.

1.3.2.2. Precisión

La precisión expresa la cercanía de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas a partir de muestreos múltiples de la misma muestra. Puede evaluarse en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. Suele expresarse como la varianza (var), desviación estándar (SD) o coeficiente de variación (CV) de una serie de mediciones.

En este caso, se determinó la precisión a dos niveles: repetibilidad (CV intraensayo) y precisión intermedia (CV interensayo), la cual expresa la variabilidad entre diferentes días de trabajo dentro del laboratorio. En la Tabla 12 se presentan los CV intra e interensayo obtenidos para ambas variantes tras analizar una serie de réplicas en 3 niveles de concentración diferentes en 3 ensayos independientes. De acuerdo con lo recomendado en las guías de validación de métodos bioanalíticos de ICH (163), los CV% intra e interensayo no deben exceder el 20%, excepto para los valores de concentración inferiores y superiores de la región lineal, en cuyo caso no deben superar el 25%. Como puede observarse, la repetibilidad y la precisión intermedia entre los replicados de las muestras evaluadas en las diferentes determinaciones no superaron el 20%, resultando aceptable para este tipo de ensayos.

Tabla 12. Parámetros obtenidos en los ensayos de precisión. CV intra e interensayo evaluados en tres niveles de concentración (alto, medio y bajo, n=6)

Proteína	Concentración (ng.mL ⁻¹)	CV intraensayo (%)			CV interensayo (%)
		1	2	3	Intermedia
rbFSH	8,0	1,9	2,3	7,1	19,0
	4,0	3,0	2,4	5,4	13,6
	2,0	0,9	1,2	6,2	8,0
rbFSH-LD	8,0	2,7	1,1	1,5	6,0
	4,0	3,1	2,3	1,1	11,5
	2,0	2,5	2,0	0,4	1,0

1.3.2.3. Exactitud y efecto matriz

La exactitud expresa el grado de concordancia entre el valor considerado verdadero y el determinado por el método analítico validado. Para evaluar este parámetro, se comparó la respuesta de un estándar interno en 3 niveles de concentración (alto, medio y bajo) con la respuesta obtenida para dicho estándar fortificado en cinco diluciones diferentes (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32) de plasma de rata, así como en una dilución (1:50) de SN de cultivo condicionado por células sCHO no recombinantes. En las Tabla 13 y Tabla 14 se presentan los valores de exactitud obtenidos para rbFSH y rbFSH-LD, respectivamente, tras analizar una serie de réplicas en 3 niveles de concentración diferentes a lo largo de 3 ensayos independientes. De acuerdo con lo recomendado en las guías de validación de métodos bioanalíticos de ICH (163), la exactitud a cada nivel de concentración debe estar dentro del $\pm 20\%$ de los valores nominales de concentración analizados. Como puede observarse, para ambas variantes, la exactitud del método se vio afectada por los componentes del

plasma, ya que fue necesario realizar una dilución 1:32 de la matriz para recuperar la exactitud observada para la muestra en el diluyente de ELISA. Por otro lado, no se observó pérdida de exactitud para la dilución 1:50 del SN.

Tabla 13. Resultado del ensayo de exactitud para la variante rbFSH.

Matriz	Concentración (ng.mL ⁻¹)		
	8,0	4,0	2,0
Diluyente	86 ± 2	102 ± 2	98 ± 1
P2	62 ± 2	62 ± 1	59 ± 2
P4	67 ± 2	67 ± 1	62 ± 3
P8	80 ± 1	100 ± 4	99 ± 3
P16	98 ± 5	116 ± 7	109 ± 5
P32	86 ± 4	102 ± 6	86 ± 3
SN50	99 ± 5	108 ± 2	89 ± 1

Tabla 14. Resultado del ensayo de exactitud para la variante rbFSH-LD.

Matriz	Concentración (ng.mL ⁻¹)		
	8,0	4,0	2,0
Diluyente	103 ± 2	105 ± 4	99 ± 1
P2	66 ± 3	95 ± 1	105 ± 1
P4	79 ± 5	88 ± 1	100 ± 1
P8	67 ± 4	94 ± 1	96 ± 1
P16	79 ± 2	103 ± 3	99 ± 3
P32	89 ± 2	112 ± 1	101 ± 1
SN50	99 ± 2	86 ± 1	103 ± 1

La pérdida de exactitud para alguna de las diluciones del plasma podría deberse a la existencia de sustancias interferentes en dichas matrices biológicas. Por este motivo, se realizó una prueba de no paralelismo (mediante regresión múltiple seguido de ANOVA) para comparar las pendientes y ordenadas al origen de las curvas dosis-respuesta del estándar interno puro y el analito fortificado en las diferentes matrices de muestra. En las Tabla 15 y Tabla 16 se presentan los resultados de la prueba de ANOVA para ambas proteínas. Como puede observarse, para la dilución 1:50 del SN no se observaron diferencias significativas con respecto a la pendiente y ordenada al origen para ninguna de las dos variantes. En el caso de la variante rbFSH, no se evidenció una diferencia estadísticamente significativa entre las pendientes de las curvas en plasma y el control en diluyente, mientras que la variante rbFSH-LD presentó diferencias significativas en las pendientes de las curvas en una dilución 1:2 y 1:4 de

plasma. No obstante, en ambas variantes, se observó una diferencia estadísticamente significativa en las ordenadas al origen para todas las diluciones de plasma.

Tabla 15. Resultado de la prueba de no paralelismo para la variante rbFSH.

Matriz	p-valor	
	Pendiente*	Ordenada al origen*
Plasma 1:2	0,8188	<0,0001
Plasma 1:4	0,9088	<0,0001
Plasma 1:8	0,1225	<0,0001
Plasma 1:16	0,1329	0,0100
Plasma 1:32	0,2191	0,0189
Sobrenadante 1:50	0,3753	0,2461

*Estadísticamente significativo cuando p-val<0,1

Tabla 16. Resultado de la prueba de no paralelismo para la variante rbFSH-LD.

Matriz	p-valor	
	Pendiente*	Ordenada al origen*
Plasma 1:2	0,0722	<0,0001
Plasma 1:4	0,0711	<0,0001
Plasma 1:8	0,2281	<0,0001
Plasma 1:16	0,8128	0,0001
Plasma 1:32	0,6361	0,0018
Sobrenadante 1:50	0,742	0,6824

*Estadísticamente significativo cuando p-val<0,1

Estos resultados indican la presencia de efecto matriz para todas las diluciones de plasma de rata. Frente a esta situación, se corrigió el efecto matriz de estas muestras realizando la dilución de la curva estándar en una dilución apropiada de plasma de rata basal.

1.4. Optimización de un ensayo de IEF para la determinación del perfil de glicoformas de las variantes de rbFSH

Con el objetivo de determinar las mejores condiciones experimentales para la caracterización del perfil de glicoformas de las variantes de rbFSH, se evaluaron geles de IEF con diferentes composiciones. En todos los casos, los geles fueron preparados con una concentración de acrilamida/bisacrilamida del 5% (P/V), urea 5 M y sacarosa 10% (P/V). En primer lugar, se evaluó la influencia de la concentración de anfolitos sobre el enfoque de las isoformas de las proteínas. En la Figura 20 (A-B) se presenta la comparación de los perfiles de las variantes de rbFSH en un gel con un gradiente de pH

de 3-5 y una concentración de anfolitos de 4% (P/V) y de 2% (P/V), respectivamente. Como puede observarse, la migración de las isoformas de ambas proteínas fue mayor en el gel que contiene la menor concentración de anfolitos, posiblemente debido a un mejor establecimiento del gradiente de pH en el tiempo de corrida. Posteriormente, se evaluó la migración de las glicofomas de las proteínas en un gel con una concentración de anfolitos de 2% (P/V) y un gradiente de pH de 3,5-5,5 (Figura 20C) y de 4-6 (Figura 20D). En este caso, se puede apreciar un mejor enfoque de la variante rbFSH en el gradiente de 4-6; sin embargo, las isoformas de rbFSH-LD no logran resolverse de forma adecuada. Por el contrario, con el gradiente de 3,5-5,5 se consiguió el mejor enfoque para ambas variantes. Por lo tanto, se optó por utilizar un gel con una concentración de anfolitos de 2% (P/V) y un gradiente de pH de 3,5-5,5 para los futuros ensayos de caracterización.

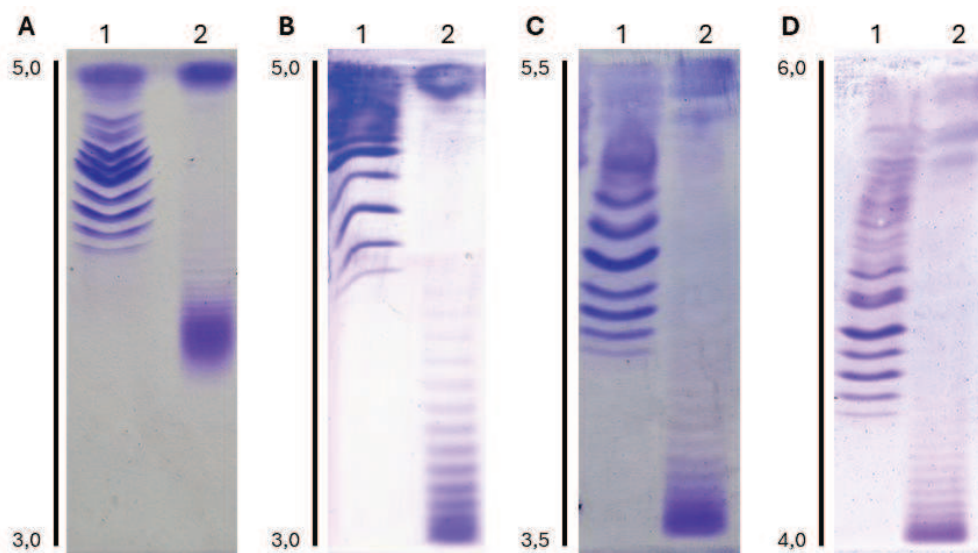


Figura 20. Optimización de ensayo de IEF para la caracterización del perfil de isoformas de las variantes de rbFSH. Se evaluaron diferentes concentraciones de anfolitos en el gel y distintos gradientes de pH. **(A)** Gradiente 3-5; anfolitos 4% (P/V). **(B)** Gradiente 3-5; anfolitos 2% (P/V). **(C)** Gradiente 3,5-5,5; anfolitos 2% (P/V). **(D)** Gradiente 4-6; anfolitos 2% (P/V). En todos los casos, el carril 1 corresponde a la rbFSH, mientras que el carril 2 corresponde a la rbFSH-LD. A la izquierda de cada figura se indica el rango de pH.

1.5. Optimización de un método de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para el análisis de las variantes de rbFSH

La metodología de HPLC se ha consolidado como la técnica principal para el análisis y la purificación de una amplia gama de moléculas (178). La característica más significativa de esta técnica es la excelente resolución que se puede lograr en una amplia variedad de condiciones para moléculas muy relacionadas, así como para moléculas estructuralmente muy distintas. Esto se debe a que todos los modos

cromatográficos se basan en interacciones moleculares que pueden manipularse sutilmente a través de cambios en las condiciones de elución, que son específicas para cada modo de cromatografía. Las proteínas interactúan con la superficie cromatográfica de una manera específica según la orientación, y su tiempo de retención está determinado por la composición molecular de regiones de contacto específicas (178). La enorme diversidad estructural de las proteínas explica las diferencias observadas en sus propiedades físicas, químicas y funcionales. Estas diferencias de comportamiento también proporcionan la base molecular para su separación y/o purificación mediante métodos de HPLC. Las propiedades de las proteínas que pueden explotarse para este fin incluyen tamaño, forma, carga, hidrofobicidad y función (179).

Con el objetivo de contar con una metodología robusta que permita determinar la pureza, identidad y estabilidad de las hormonas recombinantes, se evaluaron dos metodologías de HPLC: una cromatografía en fase reversa (RP-HPLC) y una cromatografía de exclusión molecular (SEC-HPLC).

1.5.1. Cromatografía en fase reversa (RP-HPLC)

En la cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa (RP-HPLC) la separación depende de la unión hidrofóbica de la molécula de soluto en la fase móvil a los ligandos hidrofóbicos inmovilizados en la fase estacionaria (180). Dado que este modo implica la separación de moléculas en función de su hidrofobicidad relativa, cuanto mayor sea la hidrofobicidad de la molécula, mayor será la interacción con la matriz y, por lo tanto, se requerirá una mayor concentración de solvente orgánico para lograr su elución de esta. Las fases estacionarias que se emplean normalmente en RP-HPLC son matrices de sílica modificadas con cadenas alquílicas, que proporcionan la superficie hidrofóbica donde puede tener lugar la separación (181).

Para el análisis de las variantes de rbFSH mediante RP-HPLC se evaluó una condición previamente optimizada en el laboratorio para la gonadotrofina coriónica equina recombinante (reCG) (182), la cual corresponde a un protocolo adaptado de Alvarez y col. (183). La condición de elución consistió en un gradiente lineal de acetonitrilo (ACN) en *buffer* fosfato de sodio 50 mM, pH 7. En la Figura 21A se presentan los cromatogramas superpuestos de una muestra de rbFSH y una muestra de rbFSH disociada mediante tratamiento térmico, donde puede observarse, en ambos casos, dos picos sin resolver con tiempos de retención de aproximadamente 10,5 y 11,0 min, seguidos de un pico con t_R de aproximadamente 14,1 min. Por otro lado, en la Figura 21B se muestran los cromatogramas correspondientes a una muestra de rbFSH-LD y una muestra de rbFSH-LD disociada por calor. En este caso, también se observaron dos picos sin resolver con tiempos de retención de 9,7 y 10,1 min, seguidos de otro pico

con un t_R de aproximadamente 14,1 min. Estos resultados sugieren que ambas variantes de rbFSH se disocian completamente bajo las condiciones de análisis. Ambas hormonas comparten un pico a los 14,1 min que podría corresponder a la subunidad α , ya que esta subunidad es compartida por ambas hormonas y es la que presenta mayor hidrofobicidad (184). Los picos de 10,5 y 11,0 min presentes en la rbFSH mostraron un corrimiento hacia tiempos menores en la rbFSH-LD, sugiriendo una menor hidrofobicidad (o mayor hidrofiliidad) y, por consiguiente, podrían corresponder a las subunidades β y β -LD, respectivamente. El menor t_R observado para la subunidad β -LD podría explicarse por un mayor contenido de glicanos que aumentan la hidrofiliidad de la molécula. Por lo tanto, bajo estas condiciones no es posible analizar el dímero de las variantes, ya que se observó una completa disociación. Estos resultados son similares a los reportados para hFSH en la bibliografía, donde se informa una disociación de al menos un 70% de la hormona bajo condiciones de análisis similares (185,186). Estos autores lograron desarrollar un método de RP-HPLC para el análisis de la molécula intacta de hFSH mediante el empleo de *buffer* fosfato de amonio 50 mM, pH 8,6. Sin embargo, si bien este método permitiría el análisis de la hormona intacta, no sería capaz de resolver los picos correspondientes al dímero y la subunidad β (187). Por otro lado, las condiciones de análisis desarrolladas por los autores presentan un pH de trabajo demasiado agresivo para la mayoría de columnas de sílica, cuyo rango de pH de trabajo suele ser de 2-8. Por estos motivos, se decidió descartar el método de RP-HPLC para el análisis de las variantes de rbFSH.

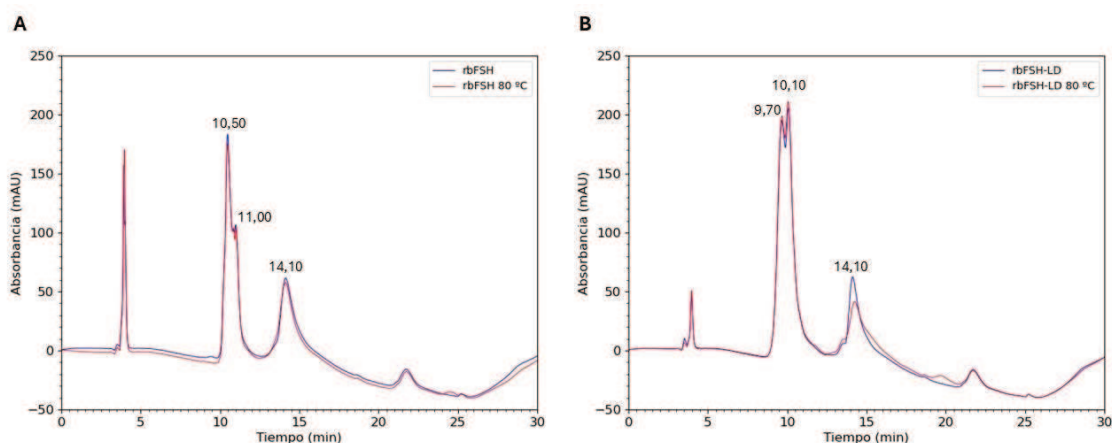


Figura 21. Perfiles de RP-HPLC de rbFSH (A) y rbFSH-LD (B). La elución se realizó con un gradiente de ACN de 10→45%. En ambos casos, se presentan los cromatogramas obtenidos para las variantes en estado nativo (azul) y luego de calentar la muestra a 80 °C por 1 h (rojo). En cada caso, se detalla el tiempo de retención (t_R) de cada pico.

1.5.2. Cromatografía de exclusión molecular (SEC-HPLC)

La masa molecular de las proteínas varía ampliamente, desde un par de miles de daltons hasta varios millones, y a veces puede representar el método más sencillo y

eficaz para su separación. Además de la masa molecular total, las proteínas también adoptan estructuras terciarias específicas que deben tenerse en cuenta al utilizar la cromatografía de exclusión molecular (SEC) para diseñar metodologías de separación exitosas. Por ejemplo, una proteína globular compacta exhibirá un tamaño molecular aparente mucho menor que su contraparte desnaturalizada y desdoblada (179). Las matrices de exclusión molecular consisten en partículas que contienen poros de tamaño bien definido. A medida que la fase móvil fluye sobre y a través de estas partículas, arrastra consigo solutos que, según el tamaño, pueden fluir hacia dentro y hacia fuera de los poros. A diferencia de otras técnicas de HPLC, la SEC no depende de ninguna interacción selectiva con la fase estacionaria. Por lo tanto, si se aplica una mezcla de proteínas o péptidos a una columna de exclusión molecular, estas moléculas se separarán por diferencias en sus tamaños o, más precisamente, volúmenes hidrodinámicos (definidos por sus radios de Stokes). Como no se requieren condiciones de elución agresivas, la SEC no compromete la estructura o actividad biológica de las proteínas, convirtiéndola en un método adecuado para el análisis de proteínas lábiles (188).

En primer lugar, para la optimización de un protocolo de SEC-HPLC para evaluar ambas variantes de la hormona se utilizó una fase móvil consistente en *buffer* fosfato de sodio, pH 6, con el agregado de sulfato de sodio 50 mM y cloruro de sodio 100 mM para limitar las interacciones electrostáticas secundarias no deseadas entre los analitos y la fase estacionaria (189). La Figura 22 (A-B) presenta los cromatogramas correspondientes a una muestra de rbFSH y rbFSH-LD, respectivamente. Para la rbFSH se observó un pico con un t_R de 11,56 min, que correspondería al dímero de la hormona, seguido de un *tailing* hasta los 15,80 min, que podría corresponder a las subunidades libres. En estas condiciones, no fue posible detectar ningún pico que sugiera la presencia de agregados de alta masa molecular (HMWA, *high molecular weight aggregates*). Para la rbFSH-LD, se observa un pico principal con un t_R de 10,12 min, que correspondería al dímero de rbFSH-LD, el cual presenta un *tailing* donde eluiría la subunidad β -LD libre, seguido de un pico entre los minutos 11,80-13,00, que podría corresponder a la subunidad α . Por otro lado, también se detectó otro pico, con un t_R de aproximadamente 9,30 min, que podría corresponder a los HMWA.

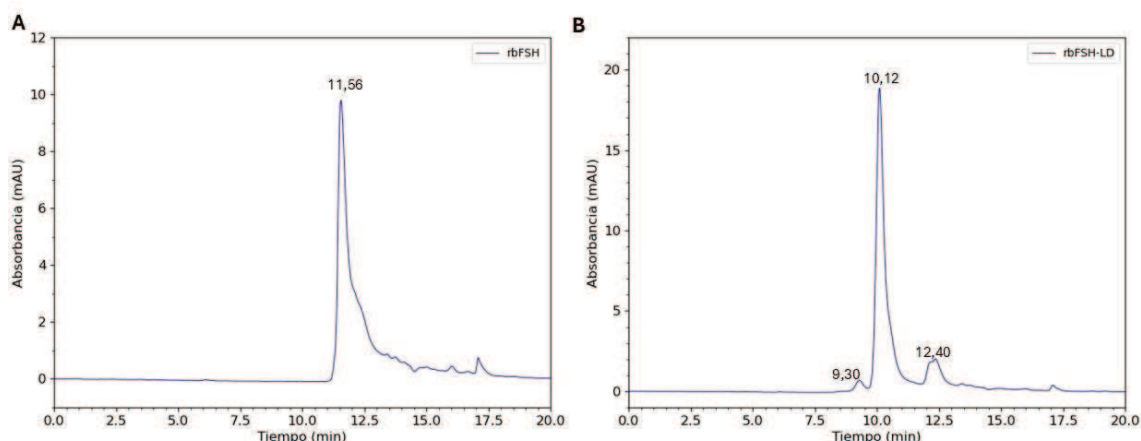


Figura 22. Perfiles de SEC-HPLC de rbFSH (A) y rbFSH-LD (B). Como fase móvil se utilizó buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 6 con el agregado de sulfato de sodio 50 mM y cloruro de sodio 100 mM para limitar las interacciones electrostáticas secundarias no deseadas entre los analitos y la fase estacionaria. En cada caso, se detalla el tiempo de retención (t_R) de cada pico.

Debido a que, en las condiciones ensayadas, no se logró una correcta resolución entre los picos del dímero y las subunidades libres, se analizó un cambio en la formulación de la fase móvil. Como se mencionó anteriormente, la SEC no depende de interacciones entre el analito y la fase estacionaria. Sin embargo, dada la naturaleza de la sílica utilizada en la mayoría de las columnas, pueden ocurrir diferentes interacciones no deseadas entre los analitos y la matriz, conduciendo a distorsión y ensanchamiento de picos junto a cambios en los tiempos de retención (190). Estas interacciones se encuentran dominadas por dos tipos de fuerzas químicas: electrostáticas e hidrofóbicas (191). Si la proteína y la superficie de la fase estacionaria tienen la misma carga, puede producirse una “exclusión iónica”. En este caso, se evita que la proteína entre en los poros de la partícula y, por lo tanto, se eluye más rápido de lo previsto. Si la proteína y la partícula tienen cargas opuestas, la adsorción de la proteína a la superficie de la fase estacionaria puede ser el resultado de interacciones de intercambio iónico y da como resultado una retención mayor a la esperada (192). Un método habitual para reducir las interacciones electrostáticas consiste en aumentar la concentración de un contraión en la fase móvil. Sin embargo, concentraciones muy altas de estos mismos iones pueden provocar un aumento de los efectos hidrofóbicos o de exclusión iónica (192). Los efectos hidrofóbicos pueden producirse a partir de la interacción del soluto con sitios hidrofóbicos en el material de empaque y conducir a una mayor retención. Además, si la interacción es pronunciada, a menudo puede conducir a problemas de recuperación, especialmente para especies de alta masa molecular (HMWS, *high molecular weight species*) (190,191). Una estrategia que se utiliza a menudo es la adición de arginina a la fase móvil para reducir las interacciones secundarias (193,194). Debido a que las hormonas glicoproteicas son proteínas relativamente hidrofóbicas, se evaluó la influencia de la arginina en la fase móvil de trabajo. En la Figura 23 se presentan los

cromatogramas obtenidos para las variantes de rbFSH sin tratamiento térmico (azul) o previamente disociadas por acción del calor (rojo). En el caso de la rbFSH (Figura 23A), no se logró, nuevamente, separar el dímero de las subunidades libres. No obstante, la nueva composición de la fase móvil permitió evidenciar la presencia de un pico de elución (10,48 min) previo al pico principal (11,40 min), que podría corresponder a HMWA. Al someter a tratamiento térmico la muestra, se observó una disminución en la intensidad del pico principal la aparición de un pico definido a un t_R de 12,24 min. La permanencia del pico a 11,40 min sugiere que parte del dímero de rbFSH permaneció intacto luego del tratamiento, mientras que el nuevo pico a los 12,24 min refuerza la idea de que las subunidades libres podrían estar eluyendo a dicho t_R . En el caso de la rbFSH-LD (Figura 23B), se observó un pico principal (10,00 min), que contendría al dímero y la subunidad β -LD, un pico a los 12,17 min, que contendría la subunidad α libre, y dos picos con baja resolución (8,83 y 9,17 min), que podrían corresponder a los HMWA de la rbFSH-LD. Al calentar la muestra, se observó un desplazamiento del pico principal a un t_R de 10,41 min y la intensificación del pico alrededor de los 12,0 min, lo que sugiere la presencia de subunidades libres en dichas fracciones.

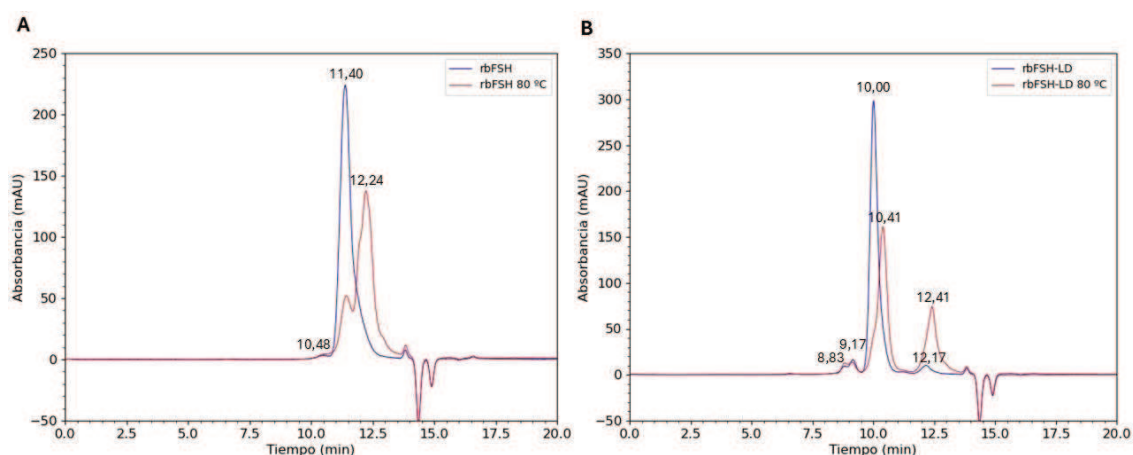


Figura 23. Perfiles de SEC-HPLC de rbFSH (A) y rbFSH-LD (B). Como fase móvil se utilizó buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7 con el agregado de arginina 200 mM. En ambos casos, se presentan los cromatogramas obtenidos para las variantes en estado nativo (azul) y luego de calentar la muestra a 80 °C por 1 h (rojo). En cada caso, se detalla el tiempo de retención (t_R) de cada pico.

Para corroborar la identidad de cada fracción, se colectaron los picos observados en los cromatogramas de las muestras sin tratamiento térmico y se analizaron mediante SDS-PAGE seguido de tinción con iones Ag^+ (Figura 24). P previo a la corrida electroforética, cada una de las fracciones fue concentrada hasta un volumen de 50 μ L. En la Figura 24A se presentan las fracciones correspondientes a la SEC-HPLC de la rbFSH, donde se observa que la fracción correspondiente al pico principal (carril 3) se encuentra enriquecida con el dímero de la hormona, mientras que la fracción correspondiente al *tailing* (carril 4) se compone en parte de dímero y de subunidades

libres. Por otro lado, no se logró observar una banda de proteína en el pico de 10,48 min (carril 2), probablemente debido al límite de detección de la técnica. En la Figura 24B se analizaron las fracciones correspondientes a la SEC-HPLC de la rbFSH-LD. En este caso, se observó la presencia de dos HMWA en la fracción correspondiente a los picos de 8,83 y 9,17 min (carril 2), un contenido mayoritario de dímero junto a trazas de subunidad β -LD y α libre en el pico principal (carril 3) y la presencia de subunidad α libre en el pico con t_R de 12,24 min (carril 5). No se observó ninguna banda proteica en la fracción correspondiente a los 11,00-12,00 min (carril 4).

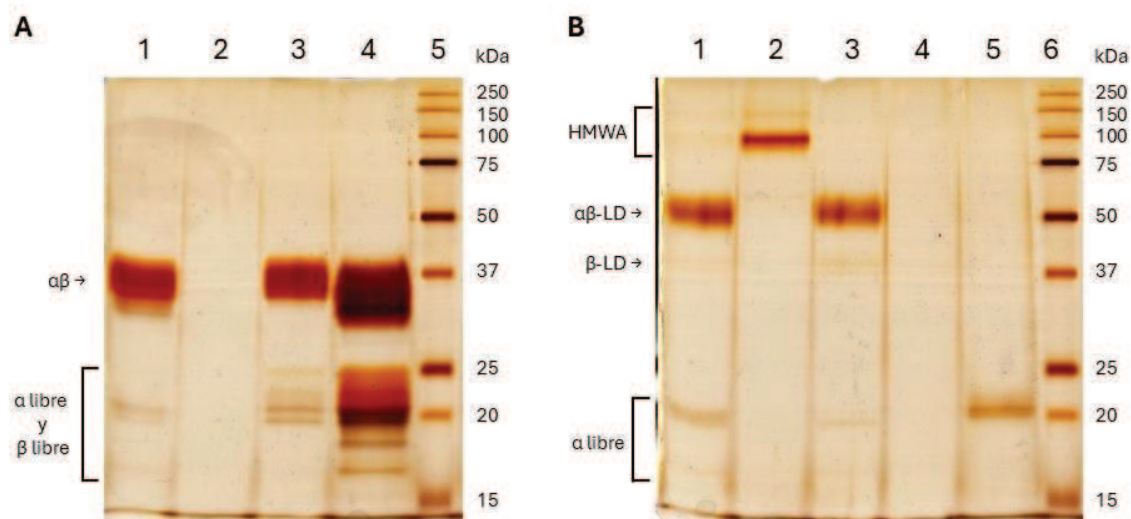


Figura 24. Análisis de fracciones de SEC-HPLC mediante SDS-PAGE seguido por tinción con iones Ag^+ . (A) Fracciones SEC-HPLC correspondientes a la variante rbFSH. Carril 1: rbFSH (150 ng). Carril 2: pico 1 (10,0-10,8 min). Carril 3: pico 2 (10,8-11,8 min). Carril 4: pico 3 (11,8-13,0 min). Carril 5: marcador de masa molecular (*Precision Plus Protein™ All Blue*). (B) Fracciones SEC-HPLC correspondientes a la variante rbFSH-LD. Carril 1: rbFSH-LD (150 ng). Carril 2: pico 1 (8,5-9,6 min). Carril 3: pico 2 (9,6-11,0 min). Carril 4: fracción comprendida entre 11,0-12,0 min. Carril 5: pico 3 (12,0-13,0 min). Carril 6: marcador de masa molecular (*Precision Plus Protein™ All Blue*). En la figura se indica la posición de cada una de las entidades proteicas que constituyen las fracciones analizadas. $\alpha\beta$: dímero de rbFSH. α libre: subunidad α libre. β libre: subunidad β libre. $\alpha\beta$ -LD: dímero de rbFSH-LD. β -LD: subunidad β -LD libre. HMWA: agregados de alta masa molecular.

A pesar de que la nueva formulación de fase móvil no logró separar completamente el dímero de las variantes de rbFSH y sus subunidades libres, permitió una mayor recuperación de los HMWA para ambas variantes. Por este motivo, se decidió continuar utilizando la fase móvil con arginina en los futuros ensayos de caracterización.

2. Desarrollo de líneas celulares recombinantes productoras de las variantes de rbFSH. Cultivo en alta densidad

2.1. Construcción de vectores de expresión para células eucariotas

Con el objetivo de obtener líneas celulares estables productoras de las variantes de rbFSH, se construyeron vectores lentivirales de tercera generación como herramienta de transferencia de material genético. Para tal fin, fue necesario como primer paso clonar las secuencias codificantes de cada una de las subunidades en los vectores lentivirales de transferencia, para luego llevar a cabo el ensamblado de las partículas lentivirales.

2.1.1. Construcción de los vectores de transferencia pLV-EF1 α -rbFSH α , pLV-EF1 α -rbFSH β y pLV-EF1 α -rbFSH β -LD

Se solicitaron a la empresa Gene Universal las secuencias sintéticas codificantes para las subunidades α y β -LD de la rbFSH, optimizadas para su expresión en células CHO-K1 y clonadas en el vector pUC57. La subunidad β -LD de la rbFSH se sintetizó fusionada a 3 copias consecutivas de la secuencia codificante del péptido mGMOP [3x(mGMOP)] en su extremo C. Adicionalmente, se incorporaron sitios de restricción para la enzima *NheI* flanqueando esta región, con el objetivo de posibilitar su remoción. Por otra parte, con el fin de facilitar la posterior purificación de las variantes de rbFSH, ambas subunidades fueron sintetizadas fusionadas a la secuencia codificante de un *tag* de histidinas (6xHis) en el extremo C. Esta etiqueta fue flanqueada por sitios de restricción para la enzima *BamHI*, con el propósito de facilitar su eventual remoción. La elección de los sitios de restricción que flanquean tanto las secuencias mGMOP como el *tag* de histidinas se realizó considerando que dichos sitios formarían parte del marco de lectura, por lo que se priorizó la inclusión de secuencias codificantes de aminoácidos pequeños y sin carga. En la Figura 25 se detallan en forma esquemática las construcciones sintetizadas.

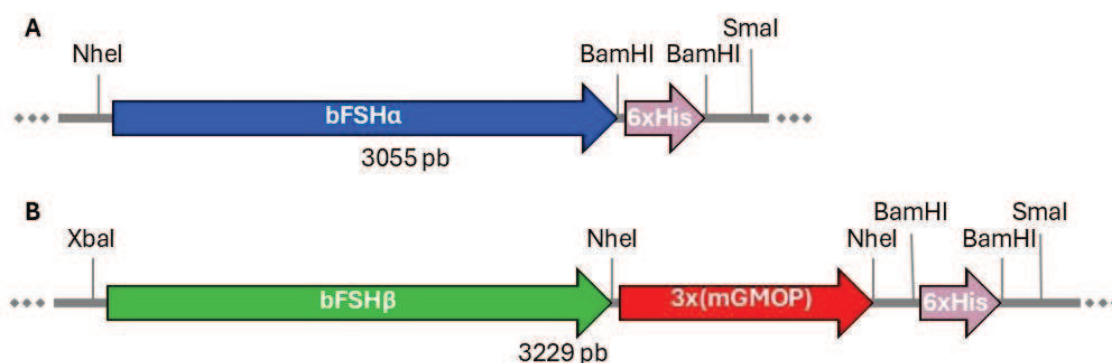


Figura 25. Representación esquemática de las construcciones sintetizadas. (A) Subunidad α de la bFSH conteniendo un tag de histidinas (6xHis). **(B)** Subunidad β de la bFSH conteniendo 3 copias de la secuencia codificante del péptido mGMOP [3x(mGMOP)] y un tag de histidinas (6xHis). En cada caso, se detalla la posición de los sitios de corte para las enzimas de restricción utilizadas con distintos fines.

Con el fin de clonar las secuencias sintetizadas en el vector de transferencia lentiviral (pLV-EF), los vectores conteniendo rbFSH α y rbFSH β -LD fueron digeridos con las enzimas *NheI*/*SmaI* y *XbaI*/*SmaI*, respectivamente. Los fragmentos de interés fueron separados mediante corrida electroforética en gel de agarosa. En la Figura 26 se observa la presencia de los fragmentos rbFSH α *NheI*/*SmaI* de 410 pb (carriles 1 y 2) y rbFSH β -LD *XbaI*/*SmaI* de 584 pb (carriles 3 y 4), los cuales fueron purificados a partir del gel. En paralelo, se digirió el vector lentiviral de transferencia (pLV-EF) con las enzimas *NheI*/*SmaI* y se purificó mediante precipitación con etanol absoluto.

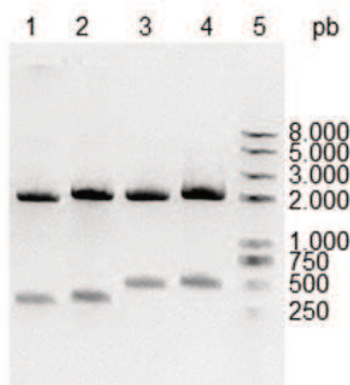


Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa 1% (P/V) para el análisis de los productos de digestión. Carriles 1 y 2. pUC57-rbFSH- α -His digerido con *NheI*/*SmaI*. Carriles 3 y 4. pUC57-rbFSH- β -(mGMOP)3-His digerido con *XbaI*/*SmaI*. Carril 5. Marcador de peso molecular 2K plus II (TransGen Biotech).

Se realizó la ligación de los productos purificados (insertos y vector) y un control con vector digerido sin inserto (vector religado) y se transformaron células *E. coli* TOP10 competentes, seleccionándose colonias al azar en medio con ampicilina. La presencia de los vectores pLV-EF1 α -rbFSH- α y pLV-EF1 α -rbFSH- β -LD se evaluó mediante PCR en colonia, analizándose los productos amplificados mediante electroforesis en gel de agarosa. En la Figura 27 se puede observar que los clones de los carriles 5A y 13B,

correspondientes a las subunidades α y β -LD, respectivamente, resultaron positivos, exhibiendo bandas de 510 y 993 pb, respectivamente, frente al fragmento de 435 pb correspondiente al control con pLV-EF (carriles 10A y 3B).

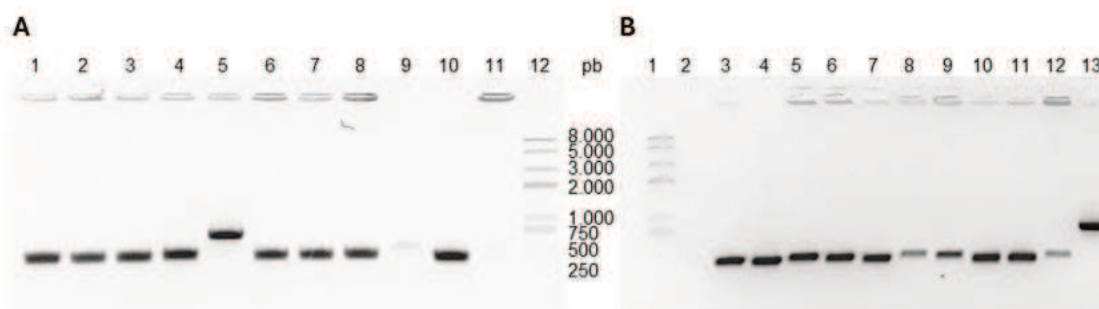


Figura 27. Electroforesis en gel de agarosa 1% (P/V) para el análisis de los productos de PCR de colonias transformadas con las construcciones pLV-EF-rbFSH- α (A) y pLV-rbFSH- β -LD (B). Carriles 1-8A y 5-13B: PCR en colonia de los clones evaluados. Carriles 9A y 4B: control de vector religado. Carriles 10A y 3B: control con vector pLV-EF. Carriles 11A y 2B: controles negativos de PCR. Carriles 12A y 1B: marcador de peso molecular 2K plus II (TransGen Biotech).

Para corroborar el resultado obtenido, se realizó una minipreparación de ADN plasmídico a partir de los clones seleccionados y su posterior digestión con la enzima *EcoRI*, evaluando la presencia del inserto mediante corrida electroforética en gel de agarosa. En la Figura 28 se puede observar que los fragmentos liberados a partir de ambos vectores (carriles 2 y 3) presentan un mayor tamaño en comparación con el fragmento liberado a partir del control correspondiente al plásmido pLV-EF digerido con la misma enzima, lo que confirma la presencia de los fragmentos de interés.

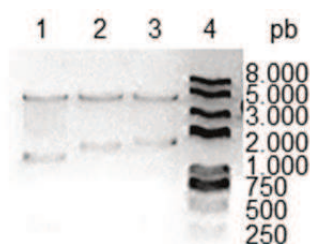


Figura 28. Electroforesis en gel de agarosa 1% (P/V) para el análisis de la digestión de los vectores pLV-EF con la enzima *EcoRI*. Carril 1: pLV-EF. Carril 2: pLV-EF-rbFSH- α . Carril 3: pLV-rbFSH- β -LD. Carril 4: marcador de peso molecular 2K plus II (TransGen Biotech).

Finalmente se llevó a cabo la secuenciación de los dos vectores de transferencia lentivirales construidos, los cuales demostraron un 100% de homología con las secuencias sintéticas de ambas subunidades.

Para la eliminación de la secuencia [3x(mGMOP)] del vector pLV-EF1 α -rbFSH- β -LD, se realizó una digestión con la enzima *NheI*, se purificó el

plásmido y se realizó el religado del mismo para generar el vector pLV-EF1 α -rbFSH- β , el que se utilizó para transformar células competentes. Se seleccionaron colonias al azar crecidas en medio con ampicilina y se realizaron minipreparaciones de ADN plasmídico. La correcta eliminación de la secuencia [3x(mGMOP)] se verificó mediante digestión enzimática con la enzima *Bgl*II y posterior corrida electroforética (Figura 29), realizándose una digestión del vector pLV-EF1 α -rbFSH- β -LD con la misma enzima como control. En todas las digestiones se obtuvieron 4 bandas de aproximadamente 3600, 2900, 670 y 560 pb. Adicionalmente, en la digestión de los clones (carriles 3-8) se observó una banda de 1000 pb, mientras que en la del control (carril 2) se obtuvo una banda de 775 pb. Esto se debe a que la secuencia [3x(mGMOP)] (135 pb) aporta un sitio adicional para la enzima *Bgl*II, generando que la banda en torno a los 1000 pb se desdoble en dos bandas de aproximadamente 775 y 390 pb (esta última no pudo apreciarse en el gel). De esta manera, los 6 clones de pLV-EF1 α -rbFSH- β analizados resultaron positivos. Finalmente, la secuenciación del ADN plasmídico de uno de los clones obtenidos confirmó la identidad del fragmento de ADN clonado en el plásmido pLV-EF1 α -rbFSH- β .

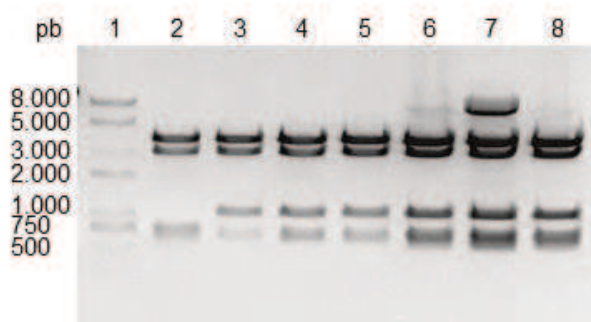


Figura 29. Electroforesis en gel de agarosa 1% (P/V) para el análisis de la digestión del vector pLV-rbFSH- β -His con la enzima *Bgl*II en las colonias transformadas. Carril 1: marcador de peso molecular 2K plus II (TransGen Biotech). Carril 2: control de digestión del vector pLV-rbFSH- β -LD. Carriles 3-8: minipreparaciones del vector pLV-rbFSH- β a partir de distintas colonias.

2.1.2. Ensamblado de partículas lentivirales (PLs)

Para llevar a cabo el ensamblado de las PLs de tercera generación, se cotransfectaron de forma transitoria células de la línea HEK 293T/17 con cuatro plásmidos: pRSV-REV, pMD.G, pMDL/pRRE y los vectores de transferencia pLV-EF1 α -rbFSH- α , pLV-EF1 α -rbFSH- β y pLV-EF1 α -rbFSH- β -LD, según el caso. Al cabo de 48 h postransfección, los SN celulares se cosecharon y se almacenaron a -70 °C fraccionados en diferentes tubos.

2.2. Obtención de líneas celulares productoras de rbFSH y rbFSH-LD

Las PLs producidas se emplearon para generar líneas celulares recombinantes productoras de rbFSH y rbFSH-LD. Para ello, se realizaron entre 3 y 4 cotransducciones (Td1, Td2, Td3 y Td4) de la línea celular sCHO-K1, cultivada en condiciones de adherencia, utilizando las PLs rbFSH α y las respectivas PLs rbFSH β o rbFSH β -LD. La producción de las hormonas por las diferentes líneas celulares generadas fue monitoreada mediante *western blot*, utilizando el mAb anti-hFSH β P3A8 (Figura 30). Para ello, se sembraron los SN de cultivo de cada línea celular, todas cultivadas a igual densidad.

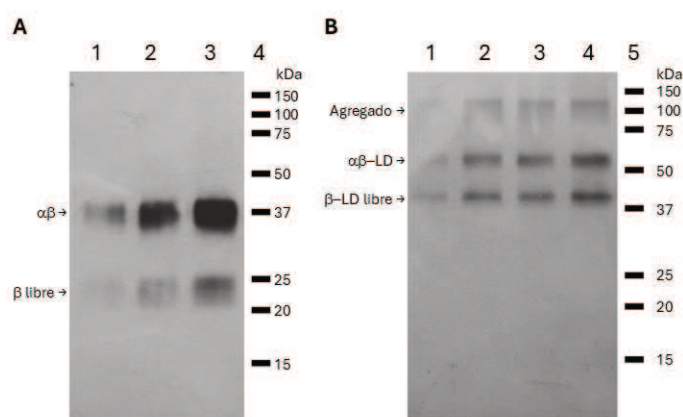


Figura 30. Evaluación de la producción de variantes de rbFSH en sobrenadantes de cultivo de líneas celulares recombinantes mediante SDS-PAGE seguido de *western blot*. Los sobrenadantes fueron tratados con SDS en condiciones no reductoras. La detección se realizó empleando el mAb anti-hFSH β P3A8. **(A)** Sobrenadantes de líneas productoras de rbFSH (sCHO rbFSH). Carriles 1 a 3: Td1, Td2 y Td3, respectivamente. Carril 4: marcador de masa molecular *Precision Plus Protein*TM (Bio-Rad). **(B)** Sobrenadantes de líneas productoras de rbFSH-LD (sCHO rbFSH-LD). Carriles 1 a 4: Td1, Td2, Td3 y Td4, respectivamente. Carril 5: marcador de masa molecular *Precision Plus Protein*TM (Bio-Rad).

El análisis de los SN de cultivo de las líneas celulares generadas mediante transducción con PLs mostró, en todos los casos, la presencia de la banda correspondiente al dímero de rbFSH (Figura 30A) y al dímero de rbFSH-LD (Figura 30B), junto con la presencia de la correspondiente subunidad β libre. En el caso de las líneas productoras de rbFSH-LD, se detectó una banda con una masa superior a los 100 kDa, correspondiente a agregados de la hormona. Asimismo, se evidenció un aumento en la intensidad de dichas bandas al incrementar el número de transducciones. Por este motivo, se seleccionaron las líneas celulares sCHO rbFSH Td3 y sCHO rbFSH-LD Td4 para continuar con el trabajo. Las mismas fueron adaptadas al crecimiento en suspensión en medio libre de suero mediante un protocolo gradual desde la condición de adherencia (DMEM/F-12 suplementado con 5% SFB) hasta el crecimiento en suspensión en medio PM, como se describe en la sección 5.9 de Materiales y Métodos.

2.3. Cultivo continuo en alta densidad

El campo biofarmacéutico ha estado dominado durante décadas por procesos en modo *fed-batch*, y esta modalidad de operación continúa siendo la más utilizada. Sin embargo, la industria ha comenzado a adoptar progresivamente procesos continuos basados en perfusión, debido a su potencial para la intensificación de la producción. En el modo de perfusión, el medio de cultivo se renueva de manera continua, lo que permite suministrar nutrientes frescos de forma constante y eliminar los subproductos tóxicos generados durante el crecimiento celular. Esta renovación se logra mientras las células permanecen retenidas dentro del biorreactor, gracias al uso de dispositivos de separación celular. El modo de perfusión permite alcanzar densidades celulares elevadas o incluso muy elevadas, manteniendo simultáneamente una alta viabilidad celular. En comparación con los cultivos en modo *batch* y *fed-batch*, el proceso de perfusión ofrece una mayor productividad volumétrica diaria, un menor tiempo de residencia del producto en el biorreactor, una mayor duración del cultivo, células en mejor estado fisiológico y un control más preciso, e incluso reversible, del microambiente celular. El corto tiempo de residencia del producto en el biorreactor favorece la obtención de proteínas de mayor calidad en comparación con el modo *fed-batch*, debido a la menor exposición a la acción enzimática de proteasas y sialidasas (195).

Con el objetivo de obtener cantidades adecuadas de las hormonas para comenzar con la optimización de los protocolos de purificación, se cultivaron las líneas celulares sCHO rbFSH Td3 y sCHO rbFSH-LD Td4 en biorreactores de 1 L de volumen de trabajo operados en modo de perfusión, utilizando un filtro tipo *spin* como dispositivo de retención celular. Los parámetros de cultivo fueron controlados en línea, manteniendo una presión de oxígeno disuelto (pO₂, con respecto a la saturación con aire) de 30%, un pH de 7,1, agitación de 100 rpm y temperatura inicial de 37 °C. Se tomaron muestras diarias para analizar la concentración y viabilidad celular, la concentración de cada proteína, y la concentración de glucosa y lactato en el medio. Estos valores se utilizaron para ajustar, cuando fuera necesario, el caudal de perfusión aplicado al biorreactor.

Ambos biorreactores, correspondientes a las líneas celulares productoras de rbFSH y rbFSH-LD, alcanzaron una densidad celular máxima de $2,7 \times 10^7$ cél.mL⁻¹, con viabilidades superiores al 97%. La perfusión se inició en el día 3, con un caudal entre 0,25 y 1 volumen de reactor por día. Por otro lado, en el día 6, se comenzó a descender la temperatura del cultivo ("suave hipotermia") con el objetivo de disminuir la tasa de crecimiento y, de este modo, mantener la densidad celular entre $1,5$ y $2,0 \times 10^7$ cél.mL⁻¹. La concentración de glucosa se mantuvo mayormente por encima de 9,5 mM, mientras

que la concentración de lactato permaneció por debajo de 20 mM en ambos biorreactores. Como se mencionó anteriormente, es importante mantener controlados los niveles de lactato, ya que concentraciones superiores a 40 mM pueden ejercer efectos tóxicos sobre el cultivo (196,197). La velocidad específica de crecimiento (μ) en la fase exponencial fue de $0,02 \text{ h}^{-1}$ en ambos casos (Figura 31). Finalmente, la concentración de proteína alcanzó aproximadamente $16 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ para rbFSH y $14 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ para rbFSH-LD. En total, se obtuvieron aproximadamente 18 L de cosecha de cada hormona.

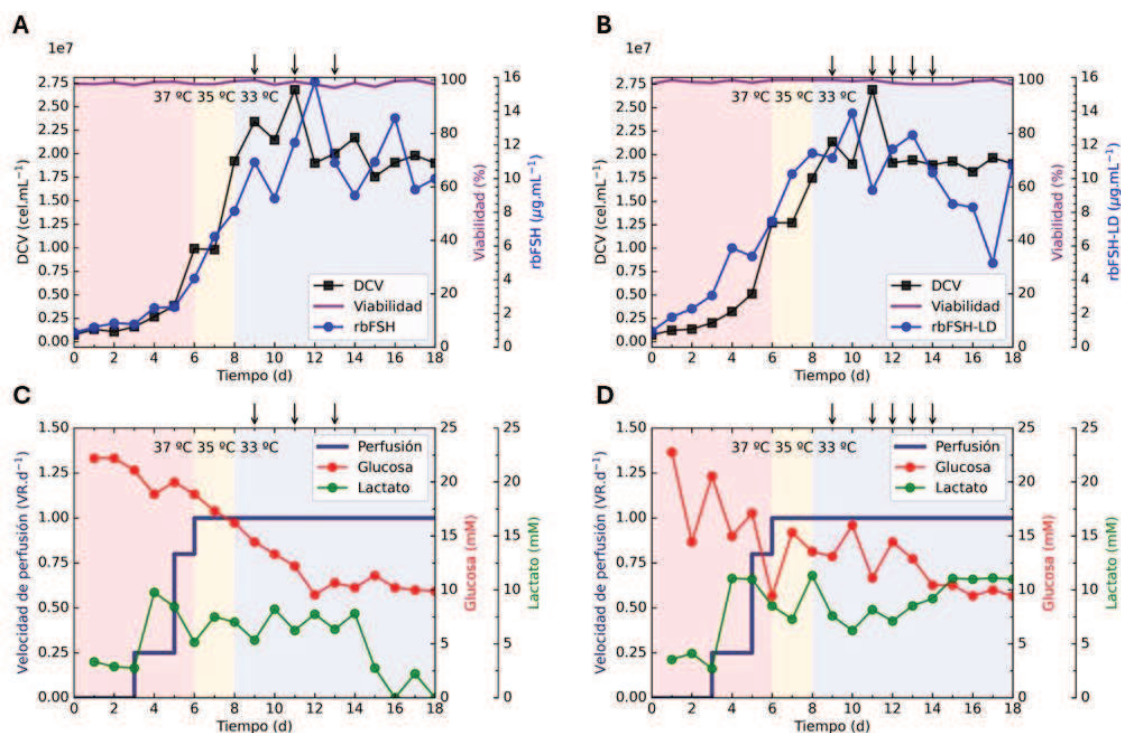


Figura 31. Cultivo de las líneas celulares recombinantes productoras de rbFSH (paneles A y C) y rbFSH-LD (paneles B y D). Se muestra la evolución de la densidad de células viables (DCV, negro), la viabilidad (violeta), la concentración de rbFSH o rbFSH-LD (azul claro), la velocidad de perfusión (azul oscuro), la concentración de glucosa (rojo) y la concentración de lactato (verde) en función del tiempo de cultivo. En cada gráfica, se indica la temperatura del cultivo de forma numérica y con un gradiente de colores. Las flechas simbolizan la remoción de células.

3. Desarrollo de un proceso de purificación de las variantes de rbFSH. Caracterización de las moléculas purificadas

3.1. Desarrollo de una metodología de purificación de las variantes de rbFSH a partir de sobrenadante de cultivo

El establecimiento de un protocolo adecuado para la purificación de un analito implica obtenerlo con un elevado grado de pureza, utilizando un número reducido de etapas para minimizar la pérdida de material. Los diversos pasos del protocolo de purificación permiten separar las entidades proteicas y no proteicas de la mezcla y, finalmente, aislar la proteína de interés del resto de las proteínas, preservando al mismo tiempo su actividad biológica e integridad química (198–203). Los pasos de separación pueden aprovechar las diferencias en las propiedades químicas, estructurales y funcionales entre la proteína objetivo y otras proteínas en la mezcla cruda. Estas propiedades incluyen tamaño, forma, carga, punto isoeléctrico, distribución de carga, hidrofobicidad, solubilidad, afinidad de unión de ligandos, unión de metales y modificaciones postraduccionales. Al explotar estas variaciones en las propiedades físicas y químicas de las proteínas, se pueden diseñar diferentes pasos de fraccionamiento o cromatográficos diferentes para el desarrollo de un esquema de purificación viable (198–203).

Un proceso típico de purificación de rhFSH consiste en 5 etapas cromatográficas, que incluye algunos de los siguientes modos cromatográficos: cromatografía de inmunoafinidad (AC, *affinity chromatography*), cromatografía de intercambio aniónico y/o catiónico (IEX, *ion exchange chromatography*), cromatografía de exclusión molecular (SEC) y/o cromatografía en fase reversa (RP) (204,205). La cromatografía de afinidad es uno de los métodos preferidos para capturar proteínas a partir de SN de cultivos celulares, ya que utiliza un ligando altamente selectivo para unirse a una proteína de interés. Un ejemplo clásico es el Fc de los mAbs, que pueden capturarse fácilmente mediante cromatografía de afinidad a proteína A. Sin embargo, muchas proteínas carecen de un ligando específico disponible, por lo que requieren la incorporación de etiquetas para facilitar su aislamiento. Una de las más utilizadas es la etiqueta de polihistidinas, que se ha convertido en una herramienta clave en investigación y desarrollo biofarmacéutico. Esta etiqueta se incorpora durante el diseño de la proteína proteína recombinante, permitiendo su captura a partir de la cosecha del cultivo celular mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados (IMAC) (206). La cromatografía IMAC ha demostrado ser una técnica altamente eficiente en el proceso de purificación de proteínas, permitiendo obtener elevados niveles de pureza en un solo paso de purificación, con una alta recuperación del producto deseado.

El método se basa en la interacción entre iones metálicos de transición (Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) inmovilizados en una matriz y cadenas laterales de aminoácidos específicos. El aminoácido que muestra la mayor interacción con las matrices de iones metálicos inmovilizados es la histidina, ya que el anillo de imidazol aporta grupos donantes de electrones que forman fácilmente enlaces de coordinación con el metal de transición. Los péptidos que contienen secuencias consecutivas de histidina son retenidos eficientemente en las matrices IMAC y, luego de un lavado para remover material unido de forma inespecífica, pueden ser eluidos fácilmente ajustando el pH o agregando imidazol al *buffer* de elución (207,208).

En el presente trabajo se explotaron las ventajas que presenta la cromatografía IMAC para desarrollar un proceso de purificación de las variantes de rbFSH, consistente en un único paso cromatográfico basado en el uso de una resina IMAC acoplada a níquel (Ni^{2+}) como ion metálico inmovilizado e imidazol como agente de elución.

3.1.1. Optimización de una cromatografía IMAC para la purificación de la variante rbFSH

Para la optimización de las condiciones cromatográficas de la purificación de la variante rbFSH, se utilizó una columna empaquetada con una resina IMAC *Sepharose* 6 FF (Cytiva) de 3,6 mL de volumen de columna (VC) previamente activada con Ni^{2+} y equilibrada con *buffer* PNI-20 (20 mM de imidazol). Se sembró una fracción de la cosecha del biorreactor de la línea celular, previamente acondicionada bajo las mismas condiciones del *buffer* PNI-20. Finalizada la etapa de siembra, se realizó un lavado de 8 VC con el mismo *buffer*, con el objetivo de remover los posibles restos de siembra y componentes no retenidos por la matriz cromatográfica. Posteriormente, para determinar la concentración óptima de imidazol para las etapas subsiguientes del proceso, se realizó en primera instancia una elución en gradiente de imidazol desde 20 mM a 500 mM. En la Figura 32 se presenta el cromatograma obtenido, donde puede observarse un primer pico en las fracciones de elución A4-A10 (correspondiente a una concentración de imidazol de ~ 75 mM), seguido de un segundo pico en las fracciones B12-B2 (correspondiente a una concentración de imidazol de ~ 200 mM), el cual se encuentra parcialmente enmascarado debido al aumento de absorbancia de la línea de base (debido a que el imidazol utilizado contiene elementos traza con la capacidad de absorber a $\lambda=280$ nm), en concordancia con el aumento de la concentración de imidazol en el *buffer* de elución.

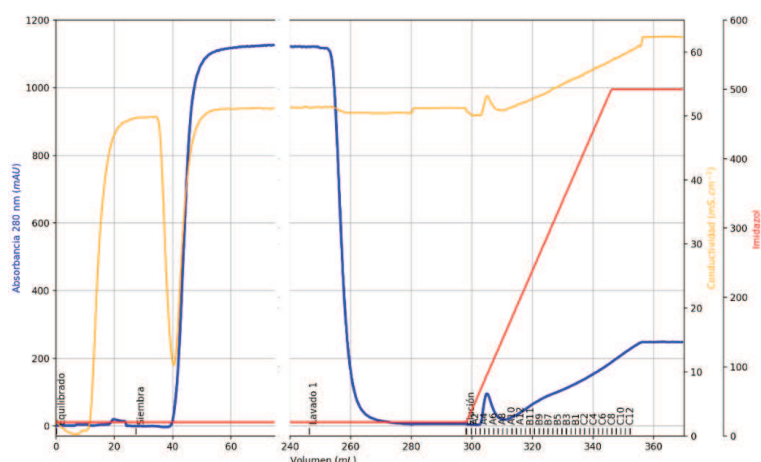


Figura 32. Purificación de rbFSH mediante cromatografía IMAC con elución por gradiente de imidazol. En el cromatograma se representan las señales de absorbancia a $\lambda = 280$ nm (azul), conductividad (naranja) y concentración de imidazol (rojo), en función del volumen de elución. Se indican las etapas de equilibrado, siembra, lavado, elución, y las fracciones colectadas durante las mismas.

Las fracciones de elución fueron analizadas mediante SDS-PAGE (Figura 33), donde puede observarse que, en el primer pico detectado, parte de la hormona eluyó en forma de dímero (~ 37 kDa) y subunidades α y β libres (ambas ~ 15 -25 kDa), junto con la totalidad de las impurezas retenidas por la matriz cromatográfica. Por otro lado, en el segundo pico de elución, se detectaron mayoritariamente dímero y subunidades libres con una pureza $>99\%$. A partir de estos resultados, se incorporó al procedimiento cromatográfico un lavado adicional con 75 mM de imidazol (*buffer* PNI-75) y una etapa de elución por salto con 200 mM de imidazol (*buffer* PNI-200).

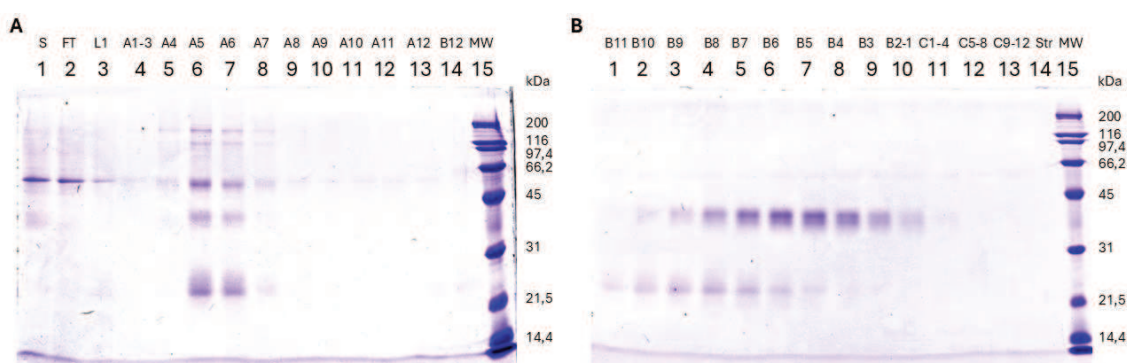


Figura 33. Evaluación de la purificación de rbFSH mediante cromatografía IMAC con elución por gradiente de imidazol. Las fracciones correspondientes a cada etapa de purificación fueron analizadas mediante SDS-PAGE seguido por tinción con CBB. Carril 1A: siembra (S). Carril 2A: *flow-through* (FT). Carril 3A: lavado (L1). Carriles 4A-14A: fracciones de elución A1-B12. Carril 15A: marcador de masa molecular *Precision Plus Protein™* (Bio-Rad). Carriles 1B-13B: fracciones de elución B11-C12. Carril 14B: stripping. Carril 15B: marcador de masa molecular *Precision Plus Protein™* (Bio-Rad).

Una vez establecida la concentración de imidazol en las etapas de lavado y elución, se empaquetó una columna con un VC de 12 mL de resina y se procedió a purificar el volumen remanente de cosechas del biorreactor. Para ello, se utilizó un flujo

de trabajo correspondiente a un tiempo de retención (t_R) de 5 min durante todo el proceso. Luego de la activación de la columna con Ni^{2+} y equilibrado con *buffer* PNI-20, se sembraron entre 2 y 3 L de cosecha acondicionada por cada proceso cromatográfico y se lavó la columna con *buffer* PNI-20 para remover el material no retenido. Posteriormente, se lavó la columna con *buffer* PNI-75 con el objetivo de eliminar las impurezas retenidas y, a continuación, se realizó la elución de la proteína utilizando *buffer* PNI-200. En la Figura 34 se presenta un cromatograma representativo de una de las purificaciones realizadas, mientras que en la Figura 35 se muestra el análisis mediante SDS-PAGE de cada una de las fracciones obtenidas. Como puede observarse, en el lavado 2 se perdió masa de dímero (carril 5, Figura 35); sin embargo, este paso permitió eliminar la totalidad de las impurezas, al tiempo que contribuyó a remover una proporción considerable de las subunidades α y β libres. En el carril 14 se observa el pico completo de elución, mientras que en los carriles 6-12 se presentan las fracciones que lo componen, todas ellas con una elevada pureza. Los principales componentes de estas fracciones corresponden al dímero de la hormona y subunidades libres, junto a una pequeña fracción de la hormona en forma de agregado (~75 kDa).

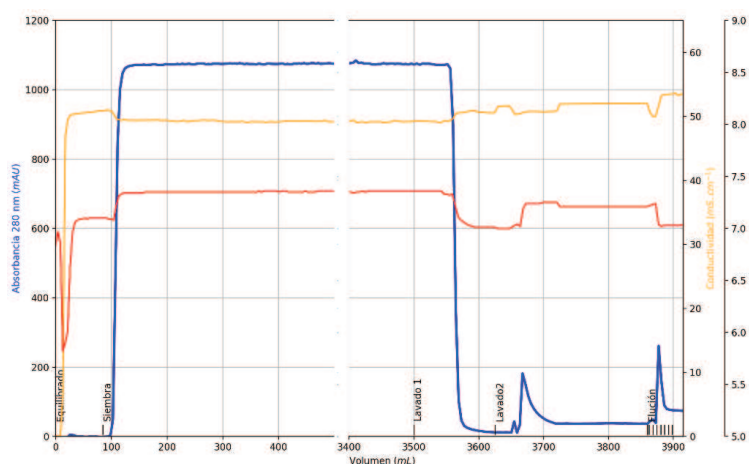


Figura 34. Purificación de rbFSH mediante cromatografía IMAC utilizando el protocolo optimizado. En el cromatograma se representan las señales de absorbancia a $\lambda=280$ nm (azul), conductividad (naranja) y pH (rojo), en función del volumen de elución. Se indican las etapas de equilibrado, siembra, lavados, elución, y las fracciones colectadas durante las mismas.

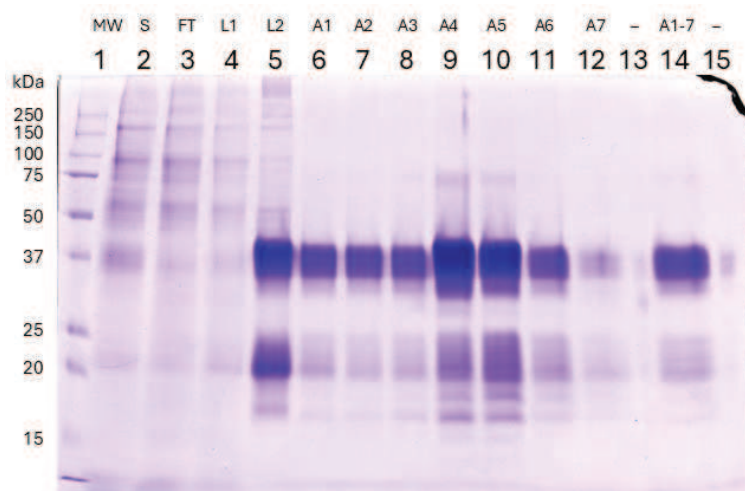


Figura 35. Evaluación de la purificación de rbFSH mediante cromatografía IMAC, utilizando el protocolo optimizado. Las fracciones correspondientes a cada etapa de purificación se analizaron mediante SDS-PAGE seguido por tinción con CBB. Carril 1: marcador de masa molecular *Precision Plus Protein™* (Bio-Rad). Carril 2: siembra (S). Carril 3: *flow-through* (FT). Carril 4: lavado 1 (L1). Carril 5: lavado 2 (L2). Carril 6: elución A1. Carril 7: elución A2. Carril 8: elución A3. Carril 9: elución A4. Carril 10: elución A5. Carril 11: elución A6. Carril 12: elución A7. Carril 13: -. Carril 14: pool de elución A1-7. Carril 15: -.

Para cada uno de los procesos cromatográficos, las fracciones de elución fueron agrupadas en un único *pool* de elución, los cuales fueron analizados mediante SDS-PAGE (Figura 36). En todos los casos, se obtuvo un porcentaje de dímero entre 62-75% y de subunidades libres entre 25-38%, con una pureza >99% y un rendimiento global del 67%. Estos valores resultaron elevados, teniendo en cuenta de que se trató de un único paso de purificación y, por lo tanto, fueron considerados apropiados para continuar con el trabajo. De este modo, todas las fracciones de elución fueron concentradas y diafiltradas contra *buffer* fosfato de sodio 50 mM pH 7,4 y conservadas a -20 °C o -70 °C hasta su utilización.

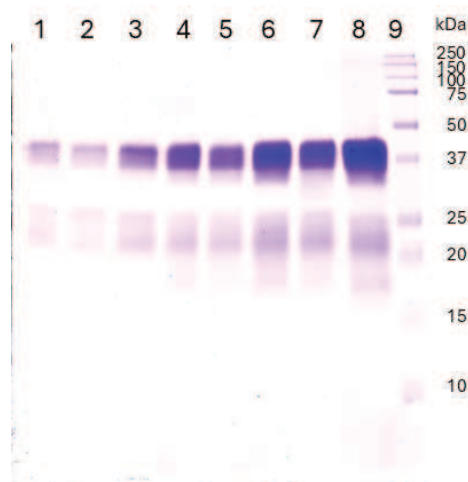


Figura 36. Evaluación de los *pools* de elución de todas las purificaciones de rbFSH mediante cromatografía IMAC. En cada una de las purificaciones, las fracciones de elución fueron agrupadas en un único *pool*, los cuales fueron analizados mediante SDS-PAGE seguido por tinción con CBB. Carriles 1-8: *pools* de elución de las purificaciones de rbFSH. Carril 9: marcador de masa molecular *Precision Plus Protein™* (Bio-Rad).

3.1.2. Optimización de una cromatografía IMAC para la purificación de la variante rbFSH-LD

De forma similar a lo realizado con la variante rbFSH, el primer paso en la optimización del proceso de purificación de rbFSH-LD consistió en determinar las concentraciones óptimas de imidazol para las etapas de lavado 2 y elución. Para ello, se utilizó una columna de 5,6 mL empaquetada con resina IMAC. Luego de la activación de la resina con Ni^{2+} y el equilibrado con *buffer* PNI-20, se sembró una fracción de la cosecha del biorreactor de la línea celular, previamente acondicionada con las mismas condiciones del *buffer* PNI-20. A continuación, se realizó un lavado de la columna con 8 VC del mismo *buffer* para remover el material no retenido, seguido de una elución en gradiente de imidazol desde 20 mM a 500 mM. En la Figura 37 se presenta el cromatograma obtenido, donde puede observarse un primer pico en las fracciones A5-A10 (correspondiente a una concentración de imidazol de ~ 50 mM), seguido de un segundo pico en las fracciones A12-B9 (correspondiente a una concentración de imidazol de ~ 200 mM). El análisis por SDS-PAGE de las fracciones de la purificación (Figura 38) demostró que en el primer pico eluyeron las impurezas retenidas junto con parte del dímero (~ 66 kDa), las subunidades β -LD (~40 kDa) y α (~20-25 kDa) libres y una fracción agregada de la hormona (~75-100 kDa). A partir de estos resultados, se incorporó al procedimiento cromatográfico un lavado adicional con 50 mM de imidazol (*buffer* PNI-50), seguido de una elución por salto con 200 mM imidazol (*buffer* PNI-200).

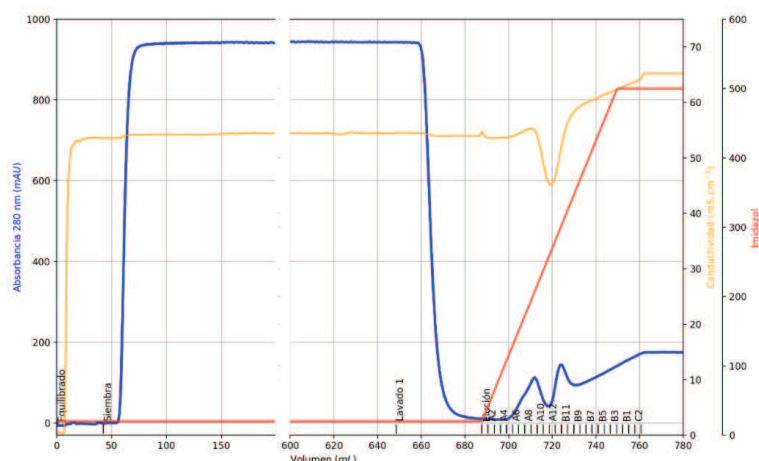


Figura 37. Purificación de rbFSH-LD mediante cromatografía IMAC con elución por gradiente de imidazol. En el cromatograma se representan las señales de absorbancia a $\lambda=280$ nm (azul), conductividad (naranja) y concentración de imidazol (rojo), en función del volumen de elución. Se indican las etapas de equilibrado, siembra, lavado, elución, y las fracciones colectadas durante las mismas.

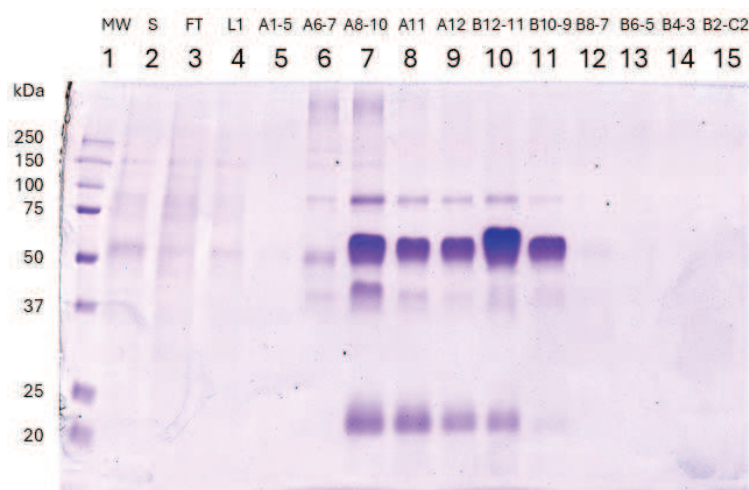


Figura 38. Evaluación de la purificación de rbFSH-LD mediante cromatografía IMAC con elución por gradiente de imidazol. Las fracciones correspondientes a cada etapa de purificación se analizaron mediante SDS-PAGE seguido por tinción con CBB. Carril 1: marcador de masa molecular *Precision Plus Protein™* (Bio-Rad). Carril 2: siembra (S). Carril 3: *flow-through* (FT). Carril 4: lavado (L1). Carriles 5-15: fracciones de elución A1-C2.

Una vez establecida la concentración de imidazol en las etapas de lavado y elución, se procedió a purificar el volumen remanente de cosechas del biorreactor, utilizando un flujo de trabajo correspondiente a un tiempo de retención (t_R) de 5 min durante todo el proceso. En cada proceso cromatográfico se sembraron entre 2 y 3 L de cosecha acondicionada, en una columna de 12 mL de VC previamente activada con Ni^{2+} y equilibrada con *buffer* PNI-20. Finalizada la etapa de siembra, se lavó la columna con *buffer* PNI-20 para remover el material no retenido y, a continuación, con *buffer* PNI-50, con el objetivo de eliminar las impurezas retenidas. Posteriormente, se realizó la elución de la proteína utilizando *buffer* PNI-200. En la Figura 39 se muestra un cromatograma típico de una de las purificaciones realizadas, donde se observan dos picos: uno durante el segundo lavado y otro en la etapa de elución. El análisis mediante SDS-PAGE de las fracciones obtenidas se presenta en la Figura 40. Como puede observarse, el lavado 2 (carril 5) permitió eliminar la mayoría de las impurezas, junto con parte de las subunidades libres y agregados de la hormona; sin embargo, en este paso también eluyó una fracción del dímero. Aun así, su inclusión en el protocolo fue clave para garantizar la pureza final del producto. Por otro lado, en los carriles 6 a 10 se presentan las diferentes fracciones del pico de elución, las cuales demostraron elevada pureza. Los principales componentes detectados incluyeron el dímero de la hormona, las subunidades α y β -LD y agregados de rbFSH-LD.

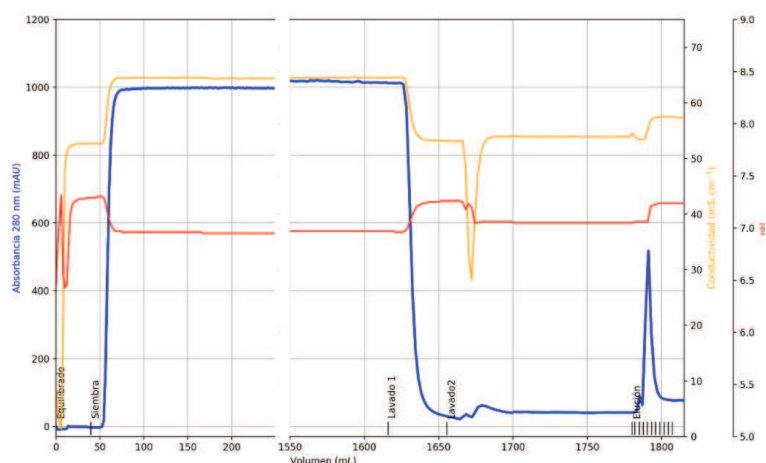


Figura 39. Purificación de rbFSH-LD mediante cromatografía IMAC utilizando el protocolo optimizado. En el cromatograma se representan las señales de absorbancia a $\lambda=280$ nm (azul), conductividad (naranja) y pH (rojo), en función del volumen de elución. Se indican las etapas de equilibrado, siembra, lavados, elución, y las fracciones colectadas durante las mismas.

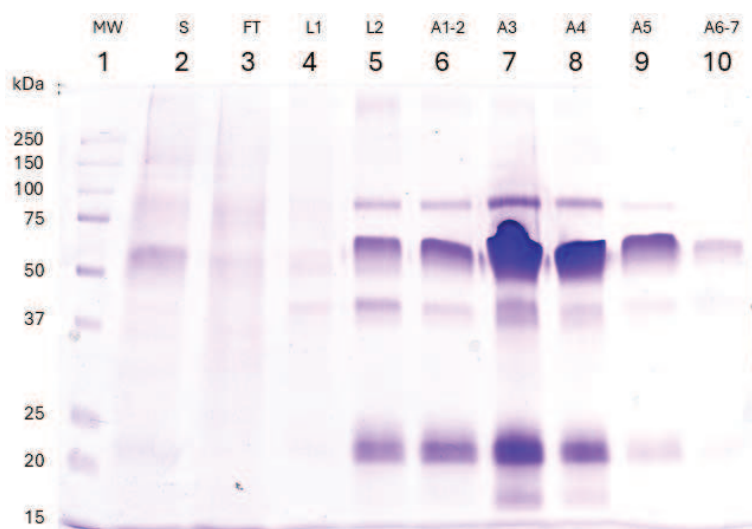


Figura 40. Evaluación de la purificación de rbFSH-LD mediante cromatografía IMAC utilizando el protocolo optimizado. Las fracciones correspondientes a cada etapa de purificación se analizaron mediante SDS-PAGE seguido por tinción con CBB. Carril 1: marcador de masa molecular *Precision Plus Protein™* (Bio-Rad). Carril 2: siembra (S). Carril 3: *flow-through* (FT). Carril 4: lavado 1 (L1). Carril 5: lavado 2 (L2). Carril 6: elución A1-2. Carril 7: elución A3. Carril 8: elución A4. Carril 9: elución A5. Carril 10: elución A6-7.

Nuevamente, para cada uno de los procesos cromatográficos, las fracciones de elución fueron agrupadas en un único *pool*, los cuales fueron analizados mediante SDS-PAGE (Figura 41). En todos los procesos, se obtuvo un porcentaje de dímero entre 54-73%, de subunidad α libre entre 17-35%, de subunidad β -LD libre entre 9-22% y de agregados de la hormona entre 3-9%, con una pureza >99% y un rendimiento global del 74%. Estos valores resultaron elevados por tratarse de un único paso de purificación y, por lo tanto, fueron considerados apropiados para continuar con el trabajo. De este modo, todas las fracciones de elución fueron concentradas y diafiltradas contra *buffer* fosfato de sodio 50 mM pH 7,4 y conservadas a -20 °C o -70 °C hasta su utilización.

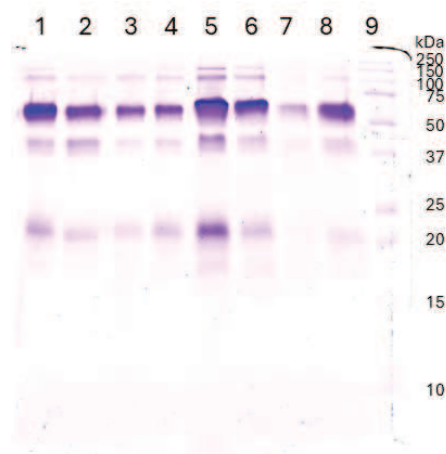


Figura 41. Evaluación de los pools de elución de todas las purificaciones de rbFSH-LD mediante cromatografía IMAC. En cada una de las purificaciones, las fracciones de elución fueron agrupadas en un único pool, los cuales fueron analizados mediante SDS-PAGE seguido por tinción con CBB. Carriles 1-8: *pools* de elución de las purificaciones de rbFSH-LD. Carril 9: marcador de masa molecular *Precision Plus Protein™* (Bio-Rad).

3.2. Caracterización fisicoquímica de las variantes de rbFSH purificadas

Uno de los primeros pasos en la caracterización fisicoquímica de un biofármaco incluye la determinación de su masa molecular y pureza. Dentro de la gran variedad de técnicas analíticas disponibles, una de las más utilizadas debido a su simplicidad y bajo costo es la electroforesis en geles de poliacrilamida. Esta metodología es adecuada para obtener información sobre la masa molecular de los compuestos, permitiendo evaluar la homogeneidad de los biofármacos y detectar la presencia de dímeros, así como variantes de menor tamaño. Por otro lado, el isoelectroenfoque (IEF) en geles de poliacrilamida es una técnica electroforética que permite separar moléculas anfóteras, como las proteínas, según su punto isoeléctrico, lo que posibilita analizar modificaciones postraduccionales que alteran la carga de las proteínas (como, por ejemplo, la glicosilación), con un alto poder resolutivo (209).

Los lotes de las variantes de rbFSH purificadas fueron caracterizados mediante metodologías electroforéticas.

3.2.1. Caracterización mediante SDS-PAGE

La masa molecular y el perfil electroforético de las hormonas recombinantes fueron comparados con los de una pFSH comercial mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Cada hormona fue analizada sin tratamiento (-) y luego de una incubación a 100 °C durante 5 min (+). Posteriormente, las proteínas se sometieron a tinción con CBB (A) o *western blot*, utilizando un pAb anti-rbFSH (B) o un mAb anti-rhFSH β (C) como anticuerpos de detección. La pFSH exhibió un patrón complejo de bandas con una amplia variedad de masas moleculares (Figura 42A, carril 1), que

permanecieron intactas luego del tratamiento térmico (Figura 42A, carril 2). Además, ambos anticuerpos reconocieron de forma específica varias de estas bandas (Figura 42B-C, carriles 1 y 2), confirmando la identidad de la molécula. Según Kato y col. (141), las subunidades α y β de la pFSH pituitaria presentan una masa molecular aparente de alrededor de 20 kDa y 25 kDa, respectivamente (analizado mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras). Esto podría indicar que muchas de las bandas presentes en la pFSH corresponden a diferentes estados de agregación de la hormona. Por otro lado, ambas bFSH recombinantes presentaron una pureza elevada (>99%). En el caso de la rbFSH, el dímero exhibió una masa molecular aparente promedio de ~40 kDa. Se detectaron trazas de subunidades α y β libres como únicos contaminantes, con masas moleculares que oscilaron entre 15 y 27 kDa (Figura 42A-C, carril 3). Luego del tratamiento térmico, el dímero de rbFSH se disoció en cada una de sus subunidades (Figura 42A-C, carril 4). Finalmente, el heterodímero rbFSH-LD exhibió una masa molecular aparente mayor a la de la rbFSH, con un valor promedio de ~60 kDa (Figura 42A, carril 5). También se detectaron trazas de subunidades libres, junto con una banda de ~100 kDa. Dicha banda podría corresponder a un agregado de la hormona, ya que permaneció intacta después del calentamiento y fue reconocida por ambos anticuerpos (Figura 42A-C, carril 6). Adicionalmente, el pAb detectó dos bandas adicionales con una masa molecular aparente mayor a 150 kDa que también persistieron tras la incubación a 100 °C (Figura 42B, carril 5-6), lo que sugiere, nuevamente, la presencia de agregados. La subunidad β -LD fue detectada por el mAb como una banda de ~44 kDa (Figura 42C, carril 6), mientras que la subunidad α mostró una masa molecular de alrededor de 15 a 22 kDa (Figura 42B, carriles 5 y 6).

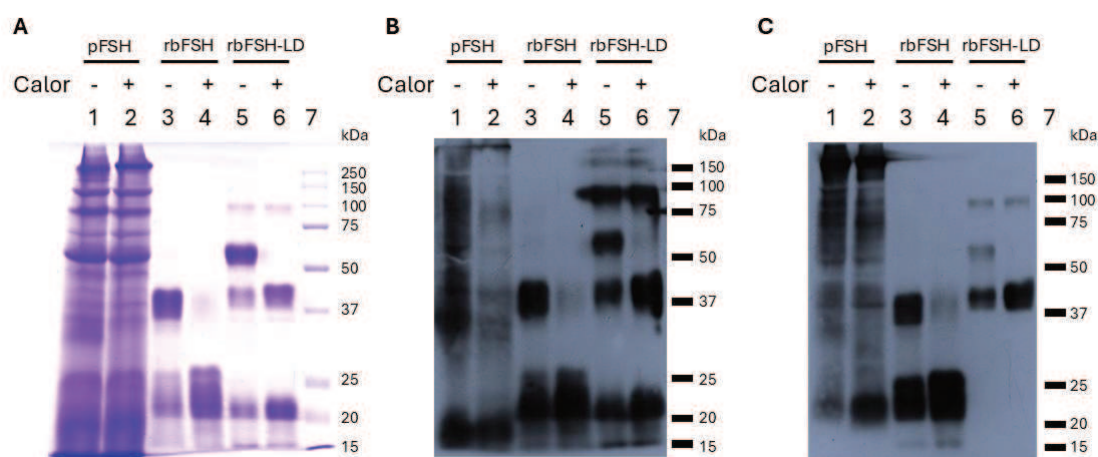


Figura 42. Análisis de la masa molecular y perfil electroforético de las variantes de rbFSH mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras. Carriles 1-2: pFSH. Carriles 3-4: rbFSH. Carriles 5-6: rbFHS-LD. El carril 7 corresponde al marcador de masa molecular *Precision Plus Protein™* (Bio-Rad). Las muestras se analizaron sin tratamiento (-) o tras calentamiento a 100 °C durante 5 min (+). Luego de la electroforesis, los geles se tiñeron con CBB (A) o se transfirieron a una membrana de PVDF y fueron detectadas con un pAb anti-rbFSH (B) o un mAb anti-hFSH β (C).

3.2.2. Caracterización del perfil de glicosilación

La caracterización de las glicoproteínas de uso terapéutico incluye el análisis de sus glicanos, con el fin de monitorear variaciones en la glicosilación que puedan afectar la eficacia terapéutica. Este análisis se encuentra entre las tareas analíticas más complejas debido a la diversidad estructural y heterogeneidad de los glicanos. En comparación con otros tipos de biomoléculas, como proteínas y péptidos, los oligosacáridos poseen numerosas características estructurales adicionales, incluyendo secuencias variables, diferentes tipos de enlace y ramificaciones entre sus monosacáridos constituyentes. Estos atributos complican aún más su elucidación estructural (210). El análisis de los N- y O-glicanos unidos a proteínas terapéuticas proporciona información crucial sobre los tipos de estructuras glicosídicas presentes, contribuye a definir la heterogeneidad de la muestra y permite establecer métodos para monitorear la variabilidad de estructuras entre diferentes sistemas de producción. La información adquirida a partir del análisis de la glicosilación de proteínas también resulta útil para establecer relaciones estructura-función (210). Debido a la complejidad y heterogeneidad de los glicanos, la similitud química entre sus subunidades de monosacáridos y la existencia de múltiples tipos de enlace entre ellos, un único método analítico rara vez proporciona un análisis completo de su estructura y composición. Por este motivo, habitualmente es necesario combinar distintas metodologías (211). Entre los métodos más utilizados para el análisis de glicanos se pueden mencionar el análisis de glicoformas mediante SDS-PAGE, IEF o electroforesis capilar; el tratamiento enzimático con endo- o exoglicosidasas; y el análisis de glicanos nativos o de monosacáridos individuales mediante diversas técnicas cromatográficas de alta resolución como la cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC, *hydrophilic interaction liquid chromatography*), de intercambio aniónico con detección amperométrica (HPAEC-PAD), de intercambio aniónico débil (WAX, *weak anion exchange*) o fase reversa, entre muchas otras (35,211,212).

Para caracterizar el perfil y la composición de glicanos en las variantes purificadas de rbFSH, se aplicaron diversas técnicas analíticas que se encontraban disponibles durante el desarrollo de este trabajo de tesis.

3.2.2.1. Deglicosilación enzimática

La deglicosilación enzimática de las hormonas recombinantes purificadas se llevó a cabo en condiciones desnaturalizantes y se analizó mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras. El tratamiento con PNGasa F produjo un cambio en la movilidad electroforética de ambas subunidades de rbFSH, desde 17-25 kDa a 11-12 kDa (Figura

43, carriles 1-2). Estas bandas corresponden a las subunidades completamente deglicosiladas (α : 11,6 kDa, β : 13,5 kDa), confirmando la presencia de N-glicanos unidos a ambas. La N-deglicosilación de la rbFSH-LD demostró resultados similares en cuanto a la subunidad α , la cual no presenta modificaciones con respecto a la hormona natural. Por otra parte, la subunidad β -LD migró como una banda de aproximadamente 33-40 kDa (Figura 43, carril 7), observándose una disminución de su masa molecular aparente a ~30,2 kDa tras la eliminación de los N-glicanos (Figura 43, carril 8). Dado que la masa teórica del polipéptido es 18 kDa, este resultado sugiere la presencia de una modificación postraduccional diferente a la N-glicosilación.

El tratamiento con neuraminidasa o con neuraminidasa más O-glicosidasa no produjo cambios en el patrón de bandas de la rbFSH N-deglicosilada (Figura 43, carriles 3 y 4), en concordancia con el hecho de que esta variante no presenta sitios potenciales para la unión de estructuras O-glicosídicas. Por el contrario, el tratamiento de la rbFSH-LD (previamente N-deglicosilada) con O-glicosidasa y neuraminidasa provocó una reducción de la masa molecular aparente de la subunidad β -LD desde 30,2 kDa a ~20 kDa (valor cercano a su masa teórica), lo que indica la presencia de O-glicosilación proporcionada por los péptidos mGMOP fusionados a dicha subunidad (Figura 43, carril 10). Además, se observó una reducción en la masa molecular de la subunidad β -LD N-deglicosilada tras el tratamiento únicamente con neuraminidasa (Figura 43, carril 9), lo que confirma la presencia de residuos terminales de ácido siálico unidos a los O-glicanos.

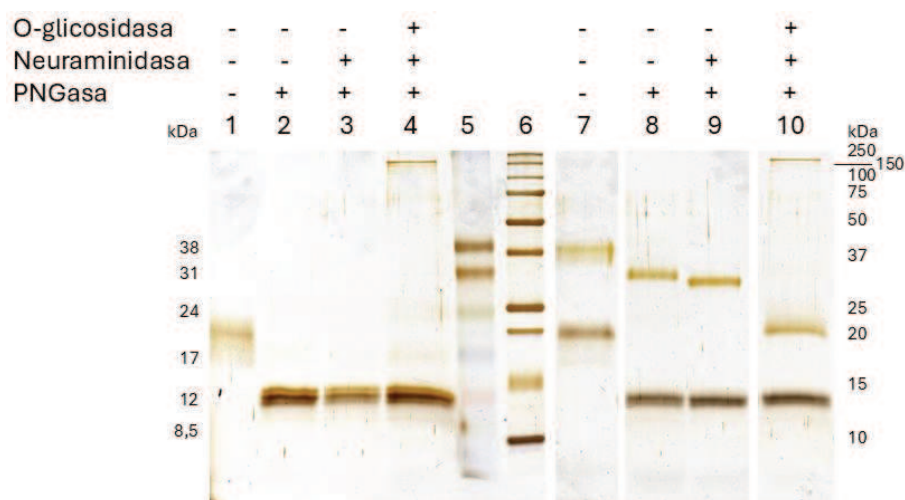


Figura 43. Deglicosilación enzimática de las variantes de rbFSH purificadas. Análisis de rbFSH (carriles 1-4) y rbFSH-LD (carriles 7-10) mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras, seguido por tinción con iones Ag^+ . Todas las muestras fueron desnaturalizadas antes de los respectivos tratamientos. Carriles 1 y 7: proteínas desnaturalizadas sin tratamiento enzimático. Carriles 2 y 8: proteínas tratadas con PNGasa F (N-deglicosiladas). Carriles 3 y 9: proteínas tratadas con PNGasa F seguida de neuraminidasa (desialiladas y N-deglicosiladas). Carriles 4 y 10: proteínas tratadas con PNGasa F seguida de neuraminidasa y O-glicosidasa (desialiladas y N- y O-deglicosiladas). Carril 5: marcador de masa molecular ECL *Low-Range Rainbow*TM (Amersham). Carril 6: marcador de masa molecular *Precision Plus Protein*TM (Bio-Rad).

3.2.2.2. Isoelectroenfoque

El perfil de glicoformas de las variantes purificadas fue analizado mediante IEF. La rbFSH-LD presentó un mayor número de isoformas que la rbFSH, distribuidas en un rango de pH más ácido (Figura 44), que podría correlacionarse con un mayor contenido de ácido siálico en la variante rbFSH-LD debido a los nuevos sitios potenciales de O-glicosilación introducidos.

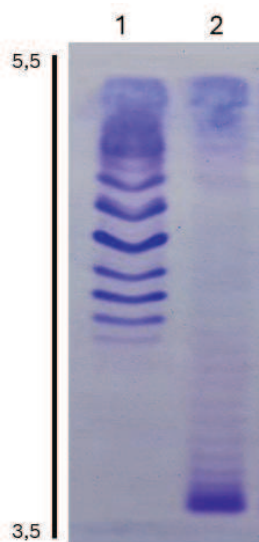


Figura 44. Análisis del perfil de isoformas de las variantes de rbFSH mediante IEF. Las variantes de rbFSH fueron analizadas en un gel con un gradiente de pH de 3,5-5,5 y una concentración de anfolitos de 2% (P/V). Carril 1: rbFSH. Carril 2: rbFSH-LD. A la izquierda de la figura se indica el rango de pH.

En conjunto, el ensayo de deglicosilación enzimática y el IEF permitieron concluir que el incremento en el número de sitios potenciales para O-glicosilación resultó no solo en un incremento de la masa molecular aparente de la proteína, sino también de su carga negativa neta. Estos resultados concuerdan con reportes previos en los que el IFN- α 2b fue fusionado ya sea con el péptido mGMOP utilizado en este trabajo (97) o con el péptido CTP de la hCG (86).

3.3. Caracterización biológica de las variantes de rbFSH purificadas

3.3.1. Evaluación de las propiedades farmacocinéticas en animales de experimentación

Las propiedades farmacocinéticas de las glicoproteínas son altamente influenciadas por los oligosacáridos que las conforman y resultan críticas para la determinación de su eficacia terapéutica. Se ha demostrado que la adición de nuevas cadenas de oligosacáridos a una proteína aumenta su peso molecular y su carga negativa, contribuyendo así a reducir su tasa de filtración glomerular. Esta mejora en las propiedades farmacocinéticas contribuye a aumentar la bioactividad de las

glicoproteínas, permitiendo reducir su dosis y frecuencia de administración y, por lo tanto, el costo asociado al tratamiento (39,86,89). Como se discutió anteriormente, el ácido siálico puede prolongar la vida media de las glicoproteínas al restringir su unión a los receptores hepáticos. De hecho, se ha demostrado que las isoformas de FSH con mayor contenido de ácido siálico tienen mayor bioactividad, probablemente debido a su menor depuración plasmática por el hígado y los riñones (83,112,213–215).

Con el propósito de evaluar la influencia del perfil glicosídico sobre los parámetros farmacocinéticos de las variantes de rbFSH, se realizaron experimentos *in vivo* utilizando animales de experimentación.

Al aplicar un modelo de absorción de primer orden para ambas moléculas, la concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$) y los primeros puntos de la farmacocinética de la rbFSH-LD no se ajustaron adecuadamente (Figura 45B y Figura 46C-D). Para solucionar este problema, el modelo utilizado para la rbFSH-LD fue modificado, agregándose compartimentos de tránsito previos al compartimento central de absorción. Con esta modificación, la predicción de la concentración plasmática de la hormona en las primeras horas y, particularmente, de la $C_{m\acute{a}x}$, mejoró notablemente (Figura 45B y Figura 46C-D). Este nuevo modelo estimó un tiempo medio de tránsito (Mtt) de aproximadamente 24 h, lo que explica el retraso observado en la absorción de esta variante. Al aplicar el mismo modelo a la rbFSH, no se obtuvo una mejora en el ajuste (Figura 45A y Figura 46A-B), por lo que se optó por conservar el modelo simplificado, es decir, sin compartimentos de tránsito.

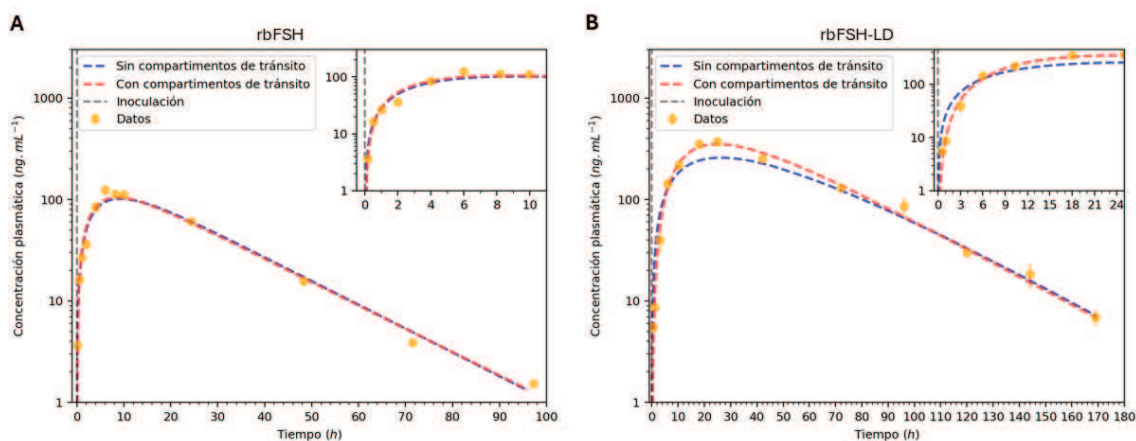


Figura 45. Comparación de modelos farmacocinéticos para rbFSH (A) y rbFSH-LD (B). Los datos se ajustaron aplicando modelos de absorción de primer orden con compartimentos de tránsito (rojo) y sin compartimentos de tránsito (azul). Las líneas discontinuas representan las concentraciones predichas por los modelos, mientras que los círculos representan la media $\pm$ SEM ($n = 4$).

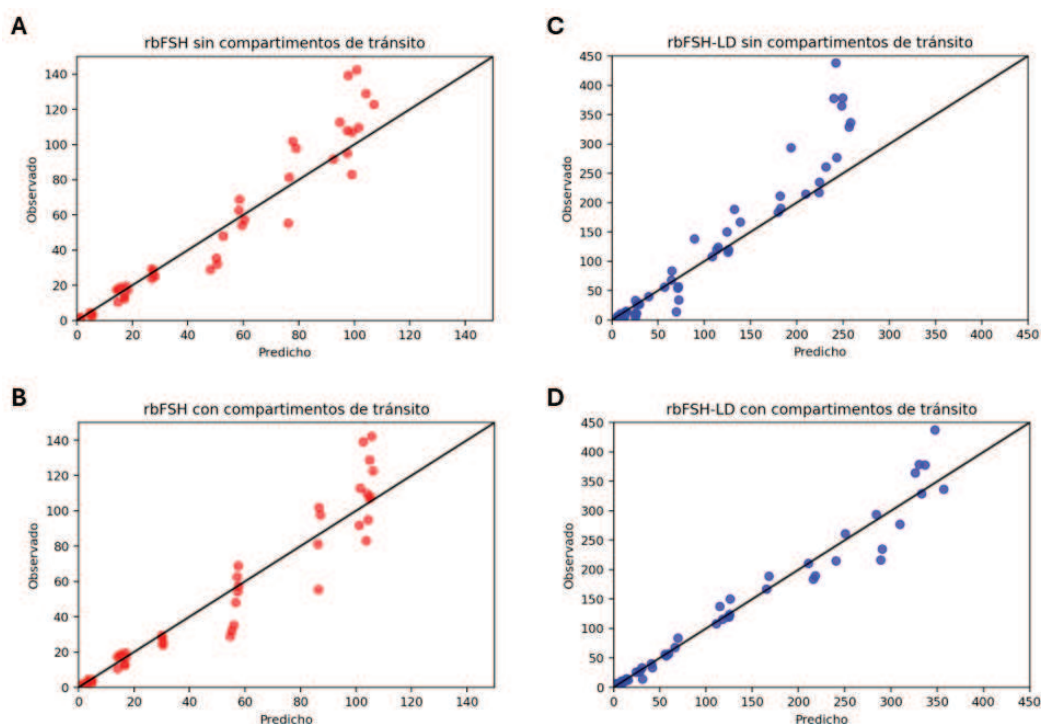


Figura 46. Gráficos de dispersión de concentraciones observadas versus predichas (ng.mL^{-1}). (A) y (C): modelo de absorción de primer orden sin compartimentos de tránsito para rbFSH y rbFSH-LD, respectivamente. (B) y (D): modelo de absorción de primer orden con compartimentos de tránsito para rbFSH y rbFSH-LD, respectivamente. La línea negra indica una correspondencia perfecta entre los valores observados y predichos.

En la Figura 47 se presenta la evolución temporal de la concentración plasmática de ambas hormonas, y en la Tabla 17 se resumen los parámetros farmacocinéticos estimados por los modelos seleccionados. La rbFSH-LD alcanzó la $C_{\text{máx}}$ aproximadamente a las 25 h ($t_{\text{máx}}$) mientras que la rbFSH lo hizo notablemente antes, alrededor de las 9 h. Además, la $C_{\text{máx}}$ de la rbFSH-LD fue aproximadamente 3,4 veces mayor que la de la rbFSH. Si bien no se encontraron diferencias significativas en la constante de absorción al compartimento central (k_a), la constante de eliminación (k) y la vida media de eliminación ($t_{1/2 \text{ elim}}$), se observó una reducción significativa de 7 veces en el *clearance* (Cl) de la rbFSH-LD.

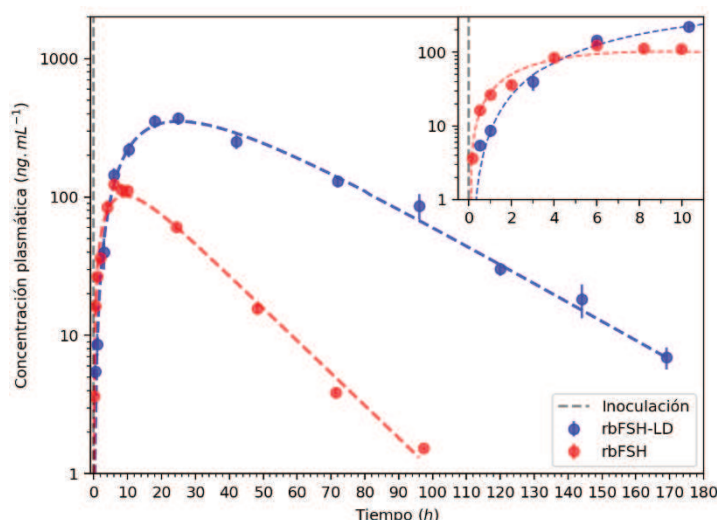


Figura 47. Estudio farmacocinético de rbFSH y rbFSH-LD en ratas Wistar hembra. Evolución de la concentración plasmática de las hormonas en función del tiempo tras una única inyección subcutánea de 50 µg de proteína. Los puntos representan la media $\pm$ SEM (n = 4). Las líneas discontinuas representan las concentraciones predichas por el modelo.

Tabla 17. Parámetros farmacocinéticos de las variantes de rbFSH

Parámetro	rbFSH	rbFSH-LD	p-valor
K_{tr} (h ⁻¹)	-	0,03 $\pm$ 0,01	-
Mtt (h)	-	24 $\pm$ 7	-
ka (h ⁻¹)	0,19 $\pm$ 0,02	0,18 $\pm$ 0,06	ns
V _D (mL)	300 $\pm$ 21	45 $\pm$ 5	< 0,001
k (h ⁻¹)	0,054 $\pm$ 0,002	0,050 $\pm$ 0,008	ns
C _{máx} (ng.mL ⁻¹)	102 $\pm$ 3	350 $\pm$ 50	< 0,001
t _{máx} (h)	9,28 $\pm$ 0,02	25 $\pm$ 2	< 0,001
t _{1/2, elim} (h)	12,80 $\pm$ 0,03	14 $\pm$ 2	ns
AUC (h.ng.mL ⁻¹)	3080 $\pm$ 90	22000 $\pm$ 4000	< 0,001
Cl (mL.h ⁻¹)	16,2 $\pm$ 0,5	2,3 $\pm$ 0,4	< 0,001

Estos resultados demuestran que la adición de nuevos sitios de O-glicosilación junto con el incremento concomitante del contenido de isoformas más ácidas (posiblemente debido a un mayor contenido de ácido siálico) de la rbFSH-LD modificó su perfil de absorción y redujo sustancialmente su *clearance* con respecto a rbFSH. Estos resultados concuerdan con los reportados para hIFN- α 2b por Sales y col. (97), quienes emplearon una única copia del péptido mGMOP, y con los de Iturraspe y col. (98), que incorporaron entre 1 y 4 copias del mismo péptido a dicha molécula. Asimismo, coinciden con estudios en los que se fusionaron otros péptidos O-glicosilados, por ejemplo CTP, a eritropoyetina (95,96), subunidad α de la hCG (59), hTSH (93), hormona de crecimiento humana (hGH) (94) y hFSH (89), logrando incrementos en la vida media en circulación y en la potencia *in vivo* de estas hormonas. Notablemente, la C_{máx} de la

rbFSH-LD fue significativamente mayor y el V_D fue considerablemente menor que los correspondientes a la rbFSH. Estos dos hechos sugieren que la rbFSH presenta una residencia plasmática menor a la de la rbFSH-LD (216).

3.3.2. Determinación de la potencia biológica *in vivo*

En hembras adultas, la FSH promueve el desarrollo de folículos preantrales inmaduros a folículos preovulatorios y la producción de estrógeno por las células de la granulosa (GC) (217). El estrógeno resulta esencial para la formación de caracteres sexuales secundarios, la selección de folículos dominantes, la inducción de la LH para la ovulación y la preparación del útero para la implantación del embrión (218). En el mercado de gonadotrofinas humanas existen diversas preparaciones de hFSH, ya sea derivadas de orina humana purificada (por ejemplo, gonadotropina menopáusica humana altamente purificada (hMG-HP) o FSH urinaria altamente purificada (u-hFSH-HP) o producidas mediante tecnología de ADN recombinante (rhFSH) (219,220). Estos productos se distinguen por su perfil de glicoformas y grado de pureza, lo cual impacta sobre su farmacocinética, farmacodinamia y respuesta clínica (220). Además, las modificaciones postraduccionales o variaciones en el proceso de fabricación (oxidación, cambios en el pH) pueden alterar sus características fisicoquímicas y, en consecuencia, su biopotencia (111,221,222). Por este motivo, la Farmacopea Europea exige la determinación rutinaria de la potencia biológica de las preparaciones de hFSH mediante el bioensayo *in vivo* originalmente descrito por Steelman y Pohley (169), el cual correlaciona la dosis de FSH (UI) administrada con el aumento del peso ovárico de ratas inmaduras frente a un estándar de referencia.

En este trabajo, la potencia biológica de las variantes de rbFSH fue evaluada mediante el ensayo recomendado por la Farmacopea Europea, utilizando el estándar internacional de hFSH (NIBSC 92/510). La actividad biológica específica (ABE) estimada fue de 4200 UI.mg⁻¹ para la rbFSH y de 10000 UI.mg⁻¹ para la rbFSH-LD.

Sobre la base de estos resultados, se seleccionó la rbFSH-LD para continuar con el trabajo, en particular, avanzar en el desarrollo de clones celulares.

4. Desarrollo de clones celulares productores de rbFSH-LD. Cultivo en alta densidad y purificación

4.1. Selección de células recombinantes mediante el empleo de puromicina

Los vectores utilizados para la generación de las líneas recombinantes poseen un gen de resistencia al antibiótico puromicina. Con el fin de enriquecer el cultivo con las células que presenten mayor productividad de rbFSH-LD, las líneas generadas fueron sometidas a presión de selección con concentraciones crecientes de dicho antibiótico, comenzando en 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ y alcanzando hasta 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Finalizado el proceso, la productividad de las distintas líneas celulares se evaluó mediante sELISA (Tabla 18), observándose un ligero aumento en la línea celular presionada con la mayor concentración del agente de selección.

Tabla 18. Productividades específicas de las diferentes líneas celulares productoras de rbFSH-LD

Línea celular	Productividad específica (pg.cel.día ⁻¹)
rbFSH-LD Td4	0,84
rbFSH-LD Td4 10P	0,90
rbFSH-LD Td4 50P	0,90
rbFSH-LD Td4 100P	0,98

4.2. Obtención de clones celulares productores de rbFSH-LD

4.2.1. Clonado de las líneas celulares

Las líneas celulares constituyen un grupo heterogéneo de células que presentan diferencias en sus características de crecimiento, niveles de expresión y, en algunos casos, en la calidad del producto. Las marcadas diferencias en los niveles de expresión de las proteínas recombinantes se deben principalmente a dos factores: diferente número de copias e integración en sitios con distinta actividad transcripcional (223). El propósito del clonado es asegurar que todas las células de un cultivo descendan de una única célula, es decir, sean genéticamente idénticas. Esto permite aislar células altamente productoras de aquéllas que no lo son, luego de los eventos de transducción y selección iniciales (161). Por otro lado, a diferencia de la línea celular, la expresión del transgén, como así también los parámetros de crecimiento, consumo de nutrientes y producción de metabolitos de un clon celular, son más homogéneos.

En este trabajo, el clonado se realizó mediante la técnica de dilución límite (160,161), cultivando las líneas celulares en placas de 96 pocillos, a razón de una célula

por pozo. Luego de entre 10 y 15 días, los SN de los cultivos en los que se observó crecimiento de un único clon celular fueron analizados mediante sELISA (Figura 48).

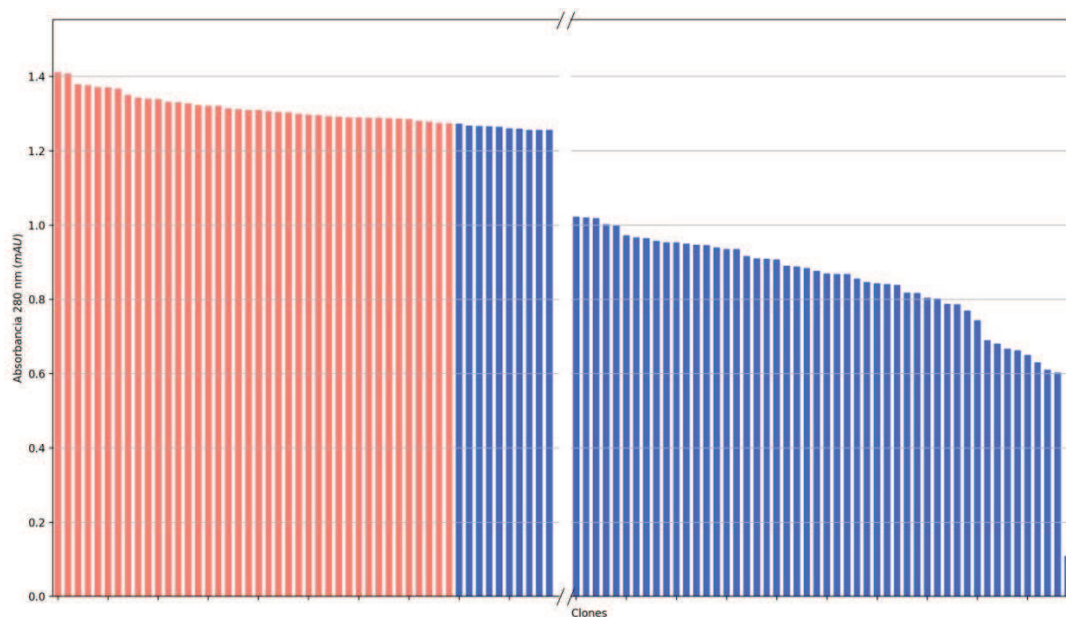


Figura 48. Primer análisis de clones productores de rbFSH-LD derivados de la línea celular sCHO rbFSH-LD Td4 100P. Para cada clon, se presenta la absorbancia obtenida mediante sELISA. Se graficaron los 50 clones que mayor y menor absorbancia presentaron. Se resaltan los 40 clones con mayor señal, los cuales fueron seleccionados para un análisis posterior.

En función de los resultados obtenidos, se subcultivaron los 40 clones que generaron mayor señal, de los cuales se seleccionaron los primeros 14 para analizar mediante SDS-PAGE seguido de *western blot* utilizando un pAb anti-rbFSH (Figura 49). En esta segunda ronda, se utilizó como criterio de selección la proporción de subunidades libres respecto del dímero de la hormona. De acuerdo con esto, se seleccionaron los clones P6D3, P7F4, P8D3 y P8D6 para un análisis posterior.

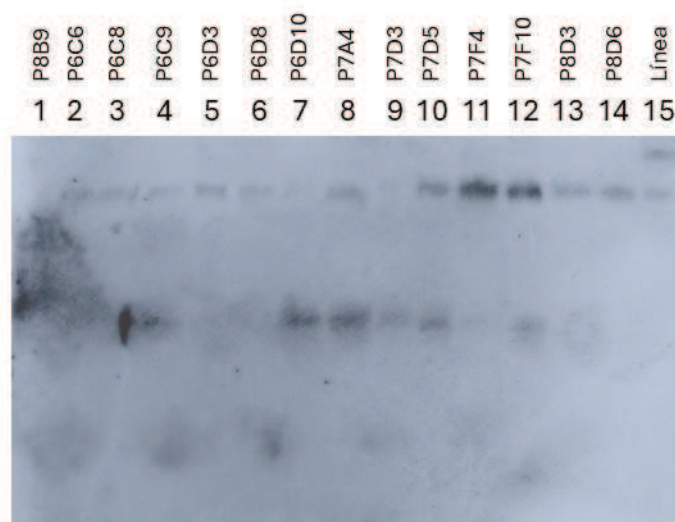


Figura 49. Segundo análisis de clones productores de rbFSH-LD derivados de la línea celular sCHO rbFSH-LD Td4 100P. Se analizaron sobrenadantes de 48 h de cultivo de cada clon mediante SDS-PAGE seguido de *western blot* utilizando un pAb anti-rbFSH.

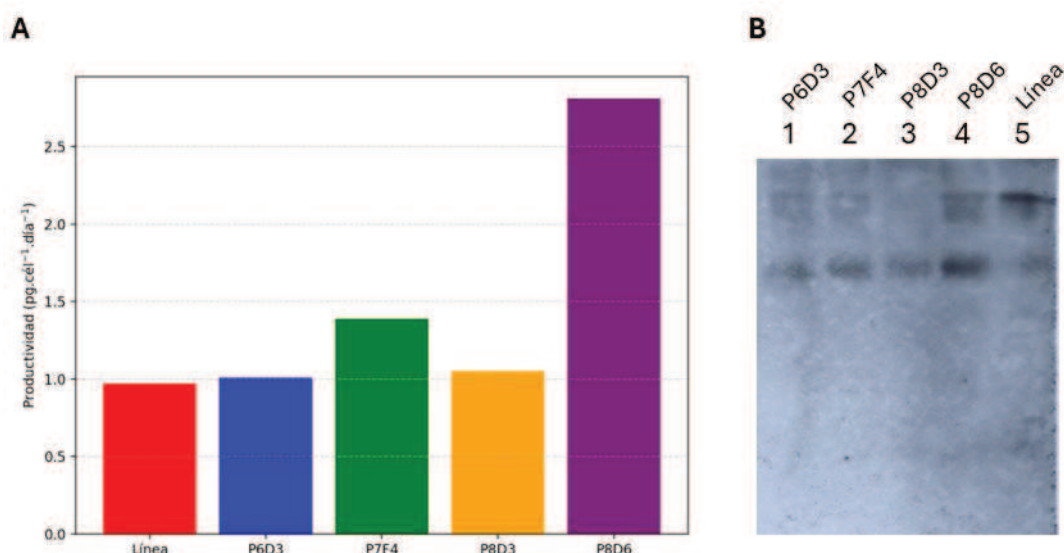


Figura 50. Tercer análisis de clones productores de rbFSH-LD derivados de la línea celular sCHO rbFSH-LD Td4 100P. Se determinó la productividad específica mediante sELISA (**A**) y el perfil electroforético mediante SDS-PAGE seguido de *western blot* utilizando un pAb anti-rbFSH (**B**), de la línea celular y de los clones seleccionados.

A continuación, se llevó a cabo un ensayo de productividad específica (de acuerdo con lo descrito en el apartado 5.10 de Materiales y Métodos) en el que los SN de cultivo de los cuatro clones fueron analizados mediante sELISA y SDS-PAGE seguido de *western blot*. Tres de los clones analizados (P6D3, P7F4 y P8D3) presentaron productividades similares o ligeramente superiores a la de la línea celular de la que derivan (Figura 50A), mientras que el clon P8D6 presentó una productividad casi 3 veces superior al resto. El análisis del perfil electroforético evidenció la presencia de agregados de la hormona en todos los clones, excepto en el clon P8D3 (Figura 50B).

En función de estos resultados, los clones P7F4, P8D3 y P8D6 fueron seleccionados para continuar con el trabajo.

4.2.2. Adaptación de clones al crecimiento en suspensión

Para lograr la adaptación de los clones celulares a crecimiento en suspensión en medio libre de SFB, se partió de un cultivo en condición de adherencia (DMEM/F-12 suplementado con 5% SFB). Cuando el cultivo se encontraba en fase exponencial de crecimiento, se realizó un subcultivo en 100% de medio PM, incubándose a 37 °C en agitador orbital a 140 rpm y 5% CO₂. Se llevó a cabo un monitoreo diario del cultivo, evaluando la viabilidad, la morfología celular y la presencia de detritos. Posteriormente, se siguieron los mismos pasos y criterios empleados para la adaptación a suspensión de las líneas celulares.

4.2.3. Análisis de las características de crecimiento, consumo de nutrientes y producción de metabolitos por parte de los clones seleccionados

Una vez culminada la adaptación, se realizó una curva de crecimiento para cada clon, con el objetivo de evaluar su cinética de crecimiento y producción de rbFSH-LD. En la Figura 51 se presentan las curvas de crecimiento (A), producción de rbFSH-LD (B), consumo de glucosa (C) y producción de lactato (D) para los tres clones seleccionados. En la Tabla 19 se describen los parámetros μ (velocidad específica de crecimiento), t_D (tiempo de duplicación), $q_{rbFSH-LD}$, q_{Lac} y q_{Glc} (velocidades específicas de producción de rbFSH-LD y de lactato, y velocidad específica de consumo de glucosa, respectivamente) para cada clon.

Todos los clones exhibieron un comportamiento similar en cuanto al crecimiento, alcanzando densidades celulares máximas de entre 4 y $6,5 \times 10^6$ cél.mL⁻¹. Los clones P7F4 y P8D3 presentaron un tiempo de duplicación cercano a las 30 h, mientras que el clon P8D6 evidenció una velocidad específica de crecimiento menor, con t_D de 42 h. Por otro lado, si bien no se observó una correlación estrictamente proporcional entre la tasa de consumo de glucosa y la velocidad de crecimiento, el clon con mayor q_{Glc} (P8D3) también presentó la mayor μ . En la Figura 51D puede observarse la producción de lactato como subproducto del metabolismo celular, a medida que la glucosa es consumida. En todos los casos, la concentración de lactato se mantuvo por debajo de 20 mM. Esto resulta relevante ya que concentraciones inferiores a este valor son bien toleradas por la mayoría de las células de mamífero; sin embargo, concentraciones superiores a 40 mM pueden producir efectos nocivos sobre el crecimiento y la productividad (196,197). En la mayoría de los clones se evidenció un cambio metabólico cuando la concentración de glucosa descendió a valores cercanos a los 5 mM (alrededor

de las 120 h de cultivo). En esta situación, donde la principal fuente de carbono (glucosa) es escasa, las células dejan de producir lactato y comienzan a utilizarlo como una fuente alternativa de carbono. Este fenómeno, conocido como *lactate shift* o *lactate switch*, ha sido reportado para diversas líneas celulares de mamífero, incluyendo células CHO (197,224,225). En relación con la producción de la proteína de interés, el clon P8D3 exhibió la mayor velocidad específica de producción de rbFSH-LD ($8,0 \text{ pg.CV}^{-1}.\text{d}^{-1}$) y también alcanzó la mayor producción acumulada (aproximadamente $70 \text{ }\mu\text{g/mL}$, en comparación con los $\sim 40 \text{ }\mu\text{g/mL}$ observados para los demás clones). En función de estos resultados, fue seleccionado para continuar con el trabajo.

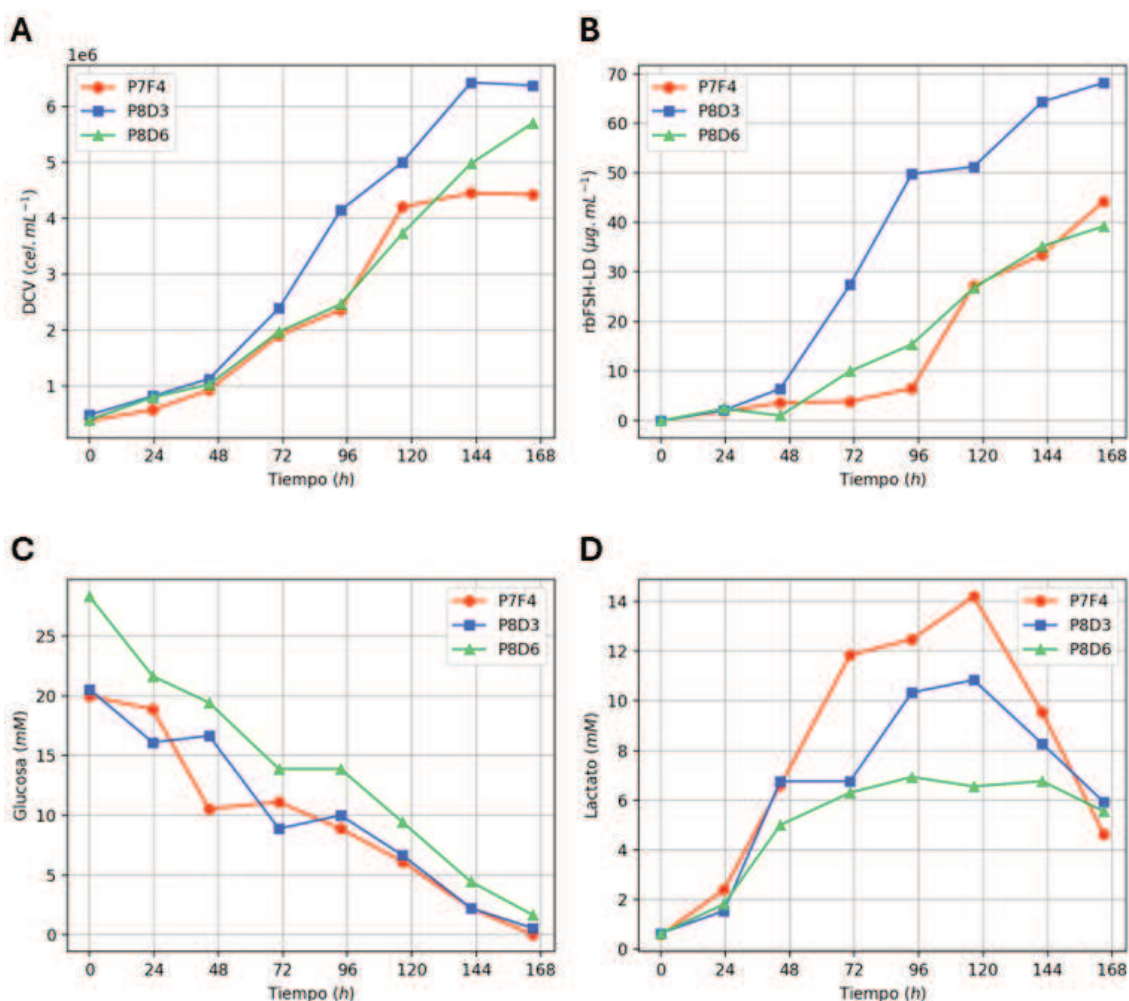


Figura 51. Cinética de crecimiento, consumo y producción de los principales metabolitos. Se muestra la evolución de la densidad de células viables (DCV) (A), la producción de rbFSH-LD (B), el consumo de glucosa (C) y la producción de lactato (D) a lo largo del tiempo, para los tres clones seleccionados.

Tabla 19. Parámetros de crecimiento, consumo de glucosa y producción de lactato y rbFSH-LD de los clones seleccionados

Clon	μ (h ⁻¹)	t_D (h)	$q_{\text{rbFSH-LD}}$ (pg.CV ⁻¹ .d ⁻¹)	q_{Glc} (pmol.CV ⁻¹ .d ⁻¹)	q_{Lac} (pmol.CV ⁻¹ .d ⁻¹)
P7F4	0,020	35	3,5	-26,0	80,0
P8D3	0,024	29	8,0	-37,0	80,6
P8D6	0,017	42	3,2	-30,4	50,0

4.3. Producción de rbFSH-LD mediante el cultivo del clon P8D3 en suspensión en biorreactores en medio libre de suero fetal bovino

El clon P8D3 productor de rbFSH-LD fue cultivado en un biorreactor de 1 L de volumen de trabajo, operado en condiciones similares a las descritas anteriormente para las líneas celulares. En la Figura 52 se presentan las principales variables del cultivo. El proceso comenzó con una densidad celular cercana a 1×10^6 cél.mL⁻¹, la cual aumentó hasta alcanzar un máximo de aproximadamente 2×10^7 cél.mL⁻¹. La perfusión se inició en el día 2, con un caudal entre 0,25 y 1 volumen de reactor por día. A partir del día 3 se implementó un descenso gradual de la temperatura, con el objetivo de disminuir la velocidad de crecimiento del cultivo y, de esta manera, mantener una densidad celular próxima a $1,2 \times 10^7$ cél.mL⁻¹. El cultivo a densidades celulares menores que las empleadas en los biorreactores de las líneas celulares permitió un control más eficiente de la saturación de oxígeno. La concentración de glucosa se mantuvo por encima de 9 mM y la de lactato por debajo de 10,6 mM durante todo el proceso. La velocidad específica de crecimiento (μ) en la fase exponencial fue de 0,019 h⁻¹. La concentración máxima de rbFSH-LD alcanzada fue de 11,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. En total, se recolectaron aproximadamente 17 L de cosecha.

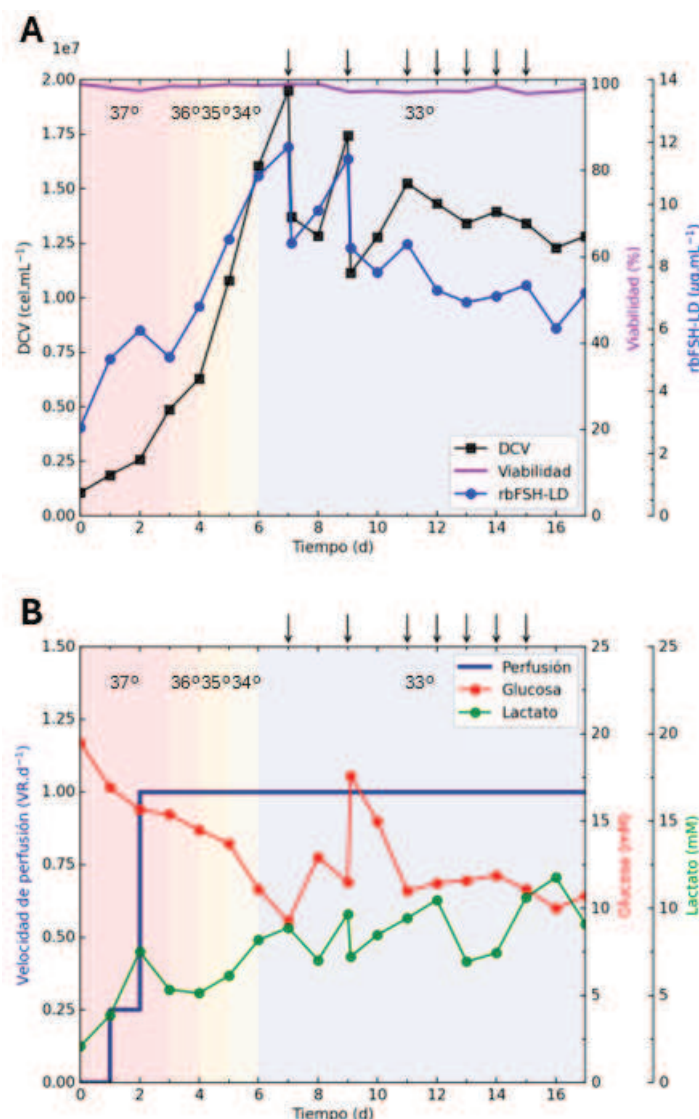


Figura 52. Cultivo del clon P8D3 productor de rbFSH-LD. (A) Evolución de la densidad de células viables (DCV, negro), la viabilidad (violeta) y la concentración de rbFSH-LD (azul claro) a lo largo del tiempo. **(B)** Evolución de la velocidad de perfusión (azul oscuro), la concentración de glucosa (rojo) y de lactato (verde) en función del tiempo de cultivo. En cada gráfica, se indica la temperatura del cultivo de forma numérica y con un gradiente de colores. Las flechas representan eventos de remoción de células.

4.4. Optimización del proceso de purificación cromatográfico de la rbFSH-LD producida por el clon P8D3

4.4.1. Evaluación de la capacidad dinámica de la resina IMAC

La determinación de la capacidad dinámica (o capacidad de unión dinámica, *dynamic binding capacity*) de las resinas es un paso esencial en la optimización de un proceso de purificación. La capacidad dinámica se define como la cantidad de producto que se unirá a la resina bajo determinadas condiciones de operación. Se calcula en función de la cantidad de proteína que se puede cargar antes de que se midan niveles significativos de producto en el *flow-through* (*breakthrough point*). La información

obtenida sobre el rendimiento de la resina es útil para evaluar las condiciones de carga y la vida útil de la columna (226).

Para determinar la capacidad dinámica de la resina IMAC se utilizó el protocolo de purificación previamente puesto a punto para la rbFSH-LD producida por la línea celular, empleando una columna de 4 mL de VC y un t_R de 5 min en todas las etapas. Se sembraron 1,1 L de cosecha del biorreactor del clon P8D3 conteniendo aproximadamente 19 mg de proteína. Se colectó el FT en fracciones de 14 mL, que posteriormente se evaluaron mediante sELISA.

A partir de los datos de concentración de rbFSH-LD presentes en el FT, se graficó la relación C/C_0 en función de la masa total de proteína ofrecida, donde C representa la concentración de rbFSH-LD en cada una de las fracciones analizadas y C_0 corresponde a la concentración de rbFSH-LD en la muestra sembrada (Figura 53).

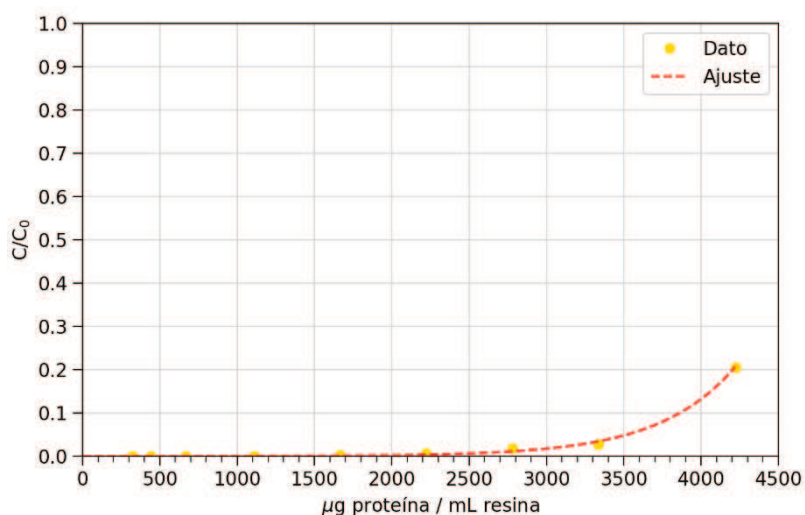


Figura 53. Determinación de la capacidad dinámica de la resina IMAC. Se graficó la relación C/C_0 en función de la masa ofrecida a la columna. Los puntos representan los datos obtenidos y la línea discontinua corresponde al ajuste mediante una función exponencial.

Como puede observarse en el gráfico, la masa de rbFSH-LD cargada no fue suficiente para construir la curva de *breakthrough* completa, ya que sólo permitió alcanzar el 20 % de la relación C/C_0 . Cabe aclarar que, en las condiciones ensayadas, la etapa de siembre implicó un tiempo aproximado de 20 h. Para completar la curva, sería necesario ofrecer a la resina un volumen mayor de cosecha (mayor masa total de proteína), lo cual, por cuestiones operativas, dificultaría el proceso cromatográfico. Mediante el ajuste de los puntos a una función exponencial, se estimó el valor de capacidad dinámica al 10% de la curva en aproximadamente 3,7 mg de rbFSH-LD por mL de resina. A partir de estos datos, se decidió trabajar sembrando una masa de rbFSH-LD que no supere la capacidad dinámica calculada.

4.4.2. Purificación de la rbFSH-LD producida por el clon P8D3

Las cosechas restantes del biorreactor del clon fueron purificadas utilizando una columna de 12 mL de VC y un t_R de 5 min en todas las etapas. Al protocolo de purificación previamente optimizado para la rbFSH-LD producida por la línea celular, se le adicionó una etapa de lavado con *buffer* PNI-200 luego de la etapa de activación, denominada blanco, con el objetivo de desprender posibles iones Ni^{2+} débilmente unidos a la matriz y, de esta manera, disminuir la pérdida de hormona durante la etapa de lavado 2. En la Figura 54 se presenta el cromatograma correspondiente a la corrida blanco, donde puede observarse un pico de absorbancia a $\lambda=393$ nm, que podría corresponder al desprendimiento de iones Ni^{2+} de la matriz. En la Figura 55 se muestran los espectros de absorción del imidazol y Ni, en los cuales se observa que los iones Ni^{2+} presentan un máximo de absorción cercano a $\lambda=393$ nm mientras que los componentes del *buffer* PNI-200 no presentan absorción en dicha región, pero sí en la zona de $\lambda=300$ nm.

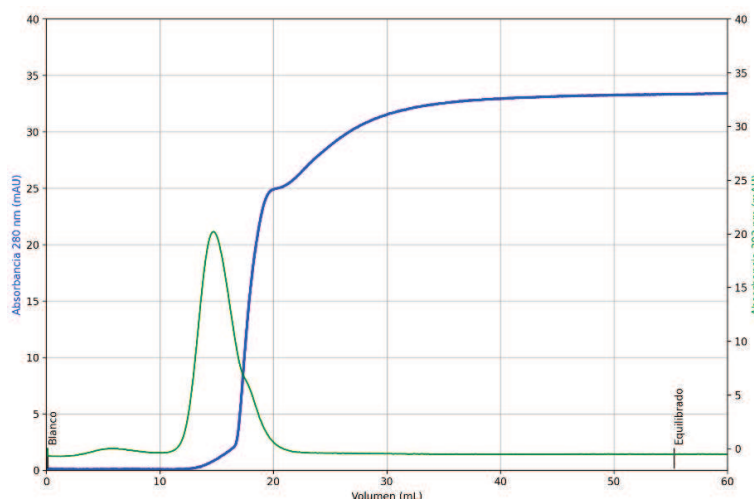


Figura 54. Cromatograma representativo de la etapa blanco. Se representan las señales de absorbancia a $\lambda=280$ nm (azul) y $\lambda=393$ nm (verde) en función del volumen de elución.

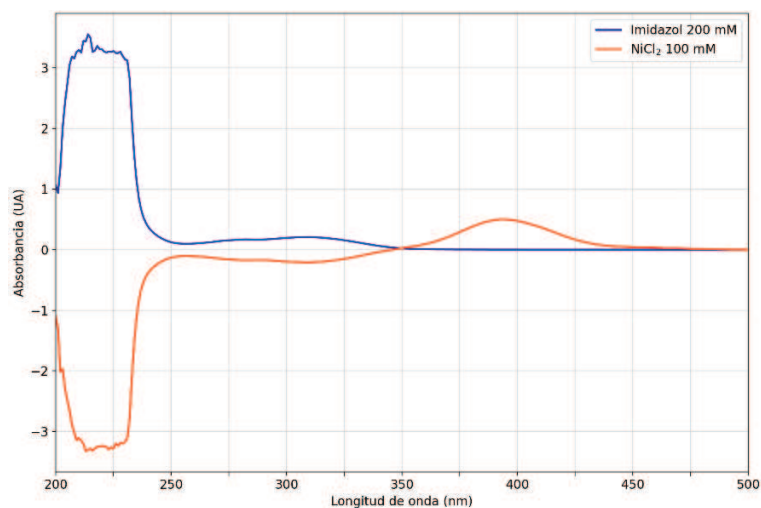


Figura 55. Espectros de absorción UV-vis de soluciones utilizadas en la cromatografía IMAC. Se detallan los espectros de una solución de imidazol 200 mM (azul) y de una solución de NiCl_2 100 mM (naranja).

En la Figura 56 se presenta el cromatograma de una de las purificaciones realizadas, donde se puede observar un pico de elución con una altura aproximadamente 10 veces superior al pico correspondiente al lavado 2.

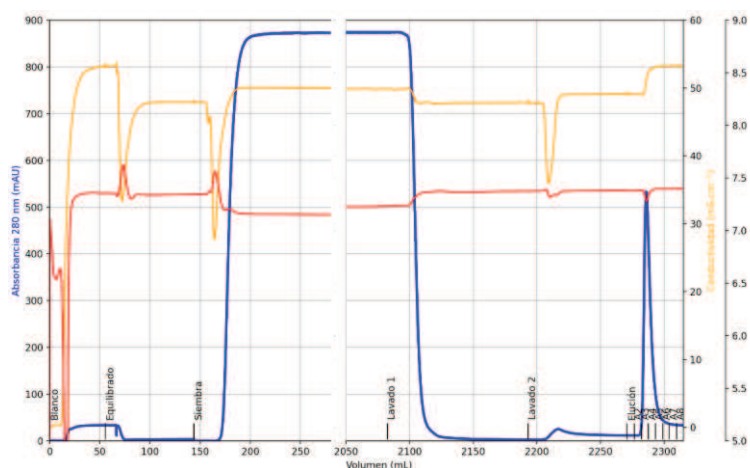


Figura 56. Purificación de rbFSH-LD producida por el clon P8D3 mediante cromatografía IMAC. En el cromatograma se representan las señales de absorbancia a $\lambda = 280 \text{ nm}$ (azul), conductividad (naranja) y pH (rojo), en función del volumen de elución. Se indican las etapas de blanco, equilibrado, siembra, lavados, elución y las fracciones colectadas durante las mismas.

El análisis de las fracciones de purificación mediante SDS-PAGE (Figura 57) permitió determinar que la hormona eluyó con una pureza elevada (>99%). Todas las proteínas no relacionadas pudieron ser eliminadas durante la etapa de lavado 2 con PNI-50. Por otro lado, en dicho lavado se logró eliminar la mayor parte de subunidades libres, al mismo tiempo que no se observó una pérdida significativa del dímero en comparación con las purificaciones anteriores realizadas a partir de la línea celular. A partir de la densitometría de la banda del carril 7 (eluato) se determinó que el 80%

corresponde al dímero de rbFSH-LD, un 10% a la subunidad β -LD y un 10% a la subunidad α libre.

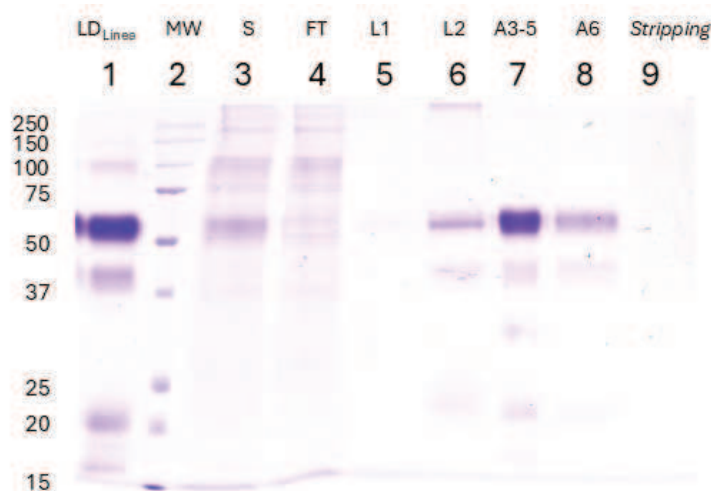


Figura 57. Evaluación de la purificación de rbFSH-LD producida por el clon P8D3 mediante IMAC. Las fracciones correspondientes a cada etapa de purificación se analizaron mediante SDS-PAGE seguido por tinción con CBB. Carril 1: control de rbFSH-LD purificada a partir de la línea celular (rbFSH-LD_{Línea}). Carril 2: marcador de masa molecular *Precision Plus Protein*TM (Bio-Rad). Carril 3: siembra (S). Carril 4: *flow-through* (FT). Carril 5: lavado 1 (L1). Carril 6: lavado 2 (L2). Carril 7: elución A3-5. Carril 8: elución A6. Carril 9: *stripping*.

Para cada uno de los procesos cromatográficos, las fracciones de elución fueron agrupadas en un único *pool*, los cuales fueron analizados mediante SDS-PAGE (Figura 58). Todos presentaron un porcentaje de dímero entre 70-87%, subunidad α libre entre 6-16% y subunidad β -LD libre entre 5-14%, con una pureza >99% y un rendimiento global del 65%. No se detectaron agregados de la hormona en ninguno de los *pools* analizados. Estos valores resultaron elevados por tratarse de un único paso de purificación y, por lo tanto, fueron considerados apropiados para continuar con el trabajo. De este modo, las fracciones de elución fueron concentradas y diafiltradas contra *buffer* fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4 y conservadas a -20 °C o -70 °C hasta su utilización.

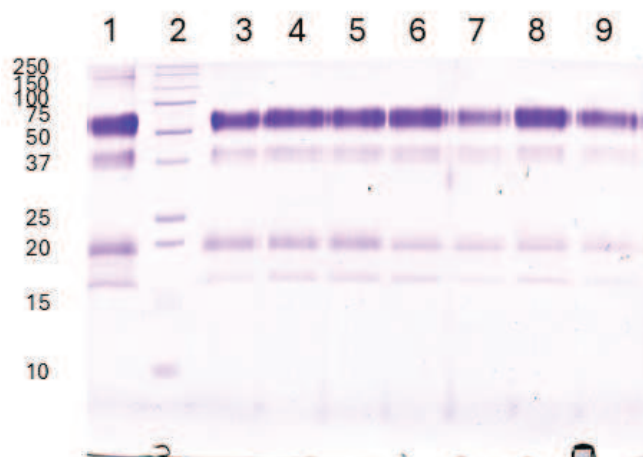


Figura 58. Evaluación de los pooles de elución de las purificaciones de rbFSH-LD producida por el clon P8D3 mediante IMAC. En cada una de las purificaciones, las fracciones de elución fueron agrupadas en un único pool de elución, los cuales fueron analizados mediante SDS-PAGE seguido por tinción con CBB. Carril 1: control de rbFSH-LD purificada a partir de la línea celular. Carril 2: marcador de masa molecular *Precision Plus Protein™* (Bio-Rad). Carriles 3-9: *pooles* de elución de las purificaciones de rbFSH-LD.

5. Caracterización comparativa de los lotes de las diferentes variantes de rbFSH

A diferencia de los fármacos convencionales de síntesis química, como la aspirina, los antibióticos o distintos agentes quimioterapéuticos, el proceso de fabricación de los productos bioterapéuticos suele ser mucho más complicado, ya que se trata de moléculas de mayor tamaño con estructuras más complejas. Estas proteínas presentan una organización estructural jerárquica que incluye distintos niveles: primario, secundario, terciario y, en algunos casos, cuaternario. Además, la mayoría de las proteínas derivadas de sistemas eucariotas experimentan modificaciones co- y/o postraduccionales en uno o más sitios de su secuencia, conduciendo a una mezcla de isoformas estructurales, fenómeno conocido como macro- y microheterogeneidad (227). En general, las proteínas deben caracterizarse en términos de identidad, heterogeneidad y contenido de impurezas. Para ello, se evalúan múltiples parámetros, como masa molecular, tamaño hidrodinámico, punto isoeléctrico, estructura, pureza y perfil de carga (estado y microheterogeneidad) (209). Existe un amplio rango de metodologías fisicoquímicas y estructurales que permiten abordar esta caracterización, proporcionando información sobre la composición, propiedades fisicoquímicas, estructura primaria y estructuras de orden superior (228).

La estructura primaria de las proteínas, es decir, la secuencia lineal de aminoácidos que la componen, puede ser determinada mediante degradación de Edman o espectrometría de masas (229,230). La estructura secundaria y terciaria de las proteínas es evaluada, generalmente, mediante métodos espectroscópicos. Hay numerosas técnicas disponibles, como la cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear (NMR, *nuclear magnetic resonance*) espectrofotometría UV-visible, fluorescencia, dispersión dinámica de la luz (DLS, *dynamic light scattering*), espectroscopía de dicroísmo circular (CD, *circular dichroism*) o espectroscopía infrarroja IR (209,228). A su vez, existen numerosos procedimientos disponibles para el estudio de la microheterogeneidad, incluyendo varias técnicas cromatográficas [como cromatografía de exclusión molecular (SEC), iónica (IEX), hidrofóbica (HIC), hidrofílica (HILIC), de intercambio aniónico de alta resolución (HPAEC) y de afinidad], electroforéticas (SDS-PAGE, IEF, 2D-PAGE, electroforesis capilar, entre otras), complementadas con diversas técnicas de detección como arreglo de diodos (DAD, *diode array detection*), detección múltiple (MALLS, *multi-angle laser light scattering*) o masa (MS^n) (209,228).

5.1. Caracterización fisicoquímica

5.1.1. SDS-PAGE

La masa molecular y el perfil electroforético de los lotes de hormonas recombinantes fueron comparados mediante SDS-PAGE seguido de tinción con CBB (Figura 59). Cada hormona se analizó en condiciones reductoras (+) y no reductoras (-). Como se observa, los lotes obtenidos presentaron una pureza superior al 99% y mostraron bandas correspondientes al dímero y a sus subunidades libres (carriles 1-3). Tal como se describió en la sección anterior, el lote de rbFSH-LD producido a partir del clon celular no presentó HMWA visibles en el gel, en contraste con la misma hormona obtenida a partir de la línea celular de origen. Bajo condiciones reductoras, el dímero se disoció por completo, lo que se reflejó en un aumento de la intensidad de las bandas correspondientes a las subunidades libres (carriles 5-7). Además, se observó la desaparición de los HMWA en la rbFSH-LD producida por la línea celular (carriles 2 y 6), lo que sugiere que dichos agregados estarían constituidos por cadenas polipeptídicas (posiblemente mal plegadas) unidas mediante puentes disulfuro. En la Tabla 20 se resumen los porcentajes de cada banda obtenidos mediante densitometría.

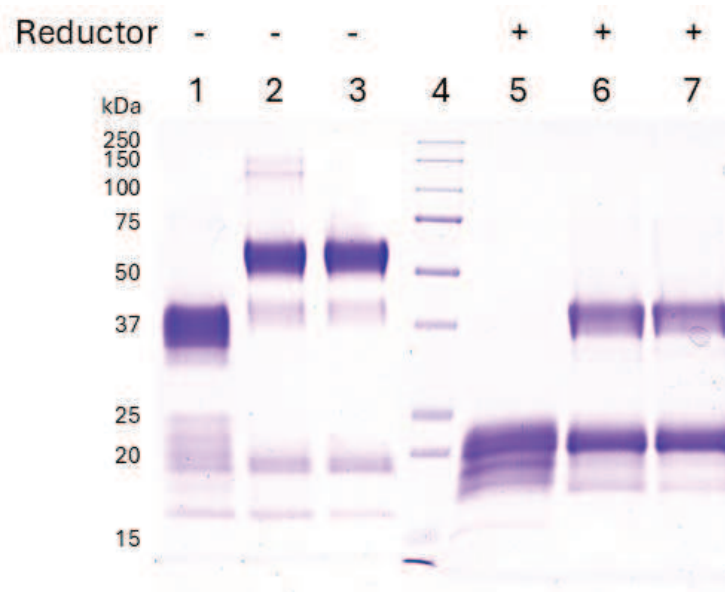


Figura 59. Perfil electroforético de los lotes de las variantes de rbFSH. SDS-PAGE seguido por tinción con CBB. Cada hormona fue analizada en condiciones reductoras (+) y no reductoras (-). Carriles 1 y 5: rbFSH. Carriles 2 y 6: rbFSH-LD línea. Carriles 3 y 7: rbFSH-LD clon. Carril 4: marcador de masa molecular *Precision Plus Protein™* (Bio-Rad).

Tabla 20. Pureza y porcentaje relativo de dímero y subunidades libres presentes en los lotes de las variantes de rbFSH

	rbFSH	rbFSH-LD línea	rbFSH-LD clon
Pureza (%)	> 99 %	>99	>99
HMWA (%)	-	5	-
Dímero (%)	73	67	76
Sub β (%)	27*	11	9
Sub. α (%)		17	15

* Suma de subunidades α y β libres

5.1.2. Isoelectroenfoque

El perfil de isoformas de cada lote fue analizado mediante IEF seguido por tinción con CBB coloidal (Figura 60). Como puede observarse, ambos lotes de rbFSH-LD presentaron perfiles de isoformas similares entre si, con un mayor número de isoformas que la rbFSH, y distribuidas en un rango de pH más ácido. Nuevamente, esto podría correlacionarse con un mayor contenido de ácido siálico en las muestras de rbFSH-LD debido a los nuevos sitios potenciales de O-glicosilación introducidos.

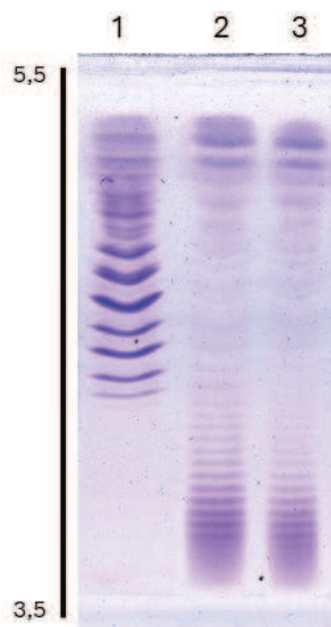


Figura 60. Análisis del perfil de isoformas de los lotes de las variantes de rbFSH mediante IEF. Las variantes de rbFSH fueron analizadas en un gel con un gradiente de pH de 3,5-5,5 y una concentración de anfólitos de 2% (P/V). Carril 1: rbFSH. Carril 2: rbFSH-LD línea. Carril 3: rbFSH-LD clon. A la izquierda de la figura se indica el rango de pH.

5.1.3. Análisis del contenido de ácido siálico mediante HPAEC-PAD

El análisis de monosacáridos es la forma más simple de caracterización de glicanos y permite determinar tanto el tipo como el porcentaje relativo de monosacáridos individuales presentes en las complejas cadenas de glicanos de las glicoproteínas terapéuticas (231). La cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución (HPAEC) es una técnica ampliamente utilizada para analizar oligosacáridos covalentemente unidos a glicoproteínas recombinantes y naturales (232,233). Los carbohidratos son ácidos débiles con valores de pKa entre 12 y 14, que pueden convertirse en su forma aniónica en un ambiente alcalino y así separarse mediante cromatografía de intercambio aniónico (234,235). Las principales ventajas de este método, cuando se acopla a un sistema de detección amperométrica pulsada (PAD), radican en su utilidad para analizar monosacáridos y oligosacáridos sin derivatización, diferenciando isómeros estructurales con un alto poder de resolución y sensibilidad en el orden de los picomoles (236).

El contenido de ácido siálico (Neu5Ac) de las variantes de rbFSH fue evaluado mediante HPAEC-PAD (Tabla 21). En concordancia con el ensayo de IEF, las dos muestras de rbFSH-LD presentaron un contenido de Neu5Ac similar entre sí (sin diferencias significativas) y 4 veces superior al de la rbFSH ($p < 0,001$). Ambos valores son superiores a los informados previamente para la pit-FSH bovina, ovina y porcina (entre 1,0 y 4,5 mol de ácido siálico/mol de proteína) (237–240). El incremento en la cantidad de residuos de Neu5Ac en la rbFSH-LD se encuentra directamente relacionado con la incorporación de nuevos sitios potenciales de O-glicosilación presentes en las secuencias del péptido mGMOP, y es congruente con los resultados obtenidos por Sales y col. (97), quienes lograron incrementar 2 veces el contenido de Neu5Ac en la molécula de IFN α -2b tras fusionar una única copia del péptido mGMOP.

Tabla 21. Análisis del contenido de Neu5Ac de los lotes de las variantes de rbFSH

Muestra	Neu5Ac (mol.mol proteína⁻¹)
rbFSH	6,0 $\pm$ 0,4
rbFSH-LD línea	23,7 $\pm$ 3,8
rbFSH-LD clon	25,0 $\pm$ 3,4

5.1.4. Espectroscopía de emisión de fluorescencia

La espectroscopía de emisión de fluorescencia es una de las técnicas biofísicas más versátiles y potentes utilizadas en estudios cualitativos, cuantitativos y estructurales de proteínas (241). La fluorescencia intrínseca de las proteínas se origina a partir de

transiciones electrónicas en los aminoácidos aromáticos como el triptófano (Trp, W), la fenilalanina (Phe, F) y la tirosina (Tyr, Y). La emisión en las proteínas está dominada por el Trp, que absorbe a la longitud de onda más larga y presenta el mayor coeficiente de extinción. La energía absorbida por la Phe y la Tyr suele transferirse a los residuos de Trp dentro de la misma proteína. La Phe presenta las longitudes de onda de excitación (λ_{ex}) y emisión (λ_{em}) más cortas, con un máximo de emisión cercano a los 282 nm. La emisión de la Tyr en agua se produce a 303 nm y es relativamente insensible a la polaridad del solvente. El máximo de emisión del triptófano en agua se produce cerca de los 350 nm y depende en gran medida de la polaridad o del entorno local (242). Debido a su alta sensibilidad a la polaridad del microambiente local, el Trp experimenta cambios en la longitud de onda máxima de emisión hacia longitudes de onda mayores (desplazamiento al rojo) o menores (desplazamiento al azul) (243,244). La posición del λ_{max} ha demostrado ser una buena medida de la exposición al solvente de los residuos de triptófano en las proteínas. Si bien la carga electrostática local también puede influir, el patrón que se ha observado es que los residuos de triptófano enterrados en regiones hidrofóbicas de las proteínas presentan un máximo de emisión en azul, ~308 nm (azurina), mientras que los residuos de triptófano expuestos al agua presentan una emisión en rojo, ~355 nm (glucagón). La exposición parcial de los residuos da lugar a máximos de emisión intermedios (241,245).

Con el objetivo de caracterizar estructuralmente los lotes de las variantes de rbFSH, se registraron los espectros de emisión bajo diferentes condiciones de estrés, y se los comparó con los espectros obtenidos de las hormonas sin tratamiento. Dado que la subunidad α presenta 5 residuos de Tyr, y las subunidades β de ambas variantes de rbFSH contienen 1 residuo de Trp y 7 de Tyr, se utilizó una longitud de onda de excitación de 275 nm para observar las contribuciones simultáneas de Tyr y Trp al espectro de emisión. Los espectros de emisión fueron registrados de 290-500 nm, con un intervalo de 1 nm.

Los espectros de la rbFSH y la rbFSH-LD del clon, ambas sin tratamiento (Figura 61A), mostraron perfiles similares, con una mayor influencia de Tyr evidenciada por la presencia de un máximo cercano a los 330 nm, consistente con los resultados previamente reportados por Groen y col. (246) para la rhFSH. En contraste, la rbFSH-LD de la línea evidenció una mayor contribución del Trp, con un ligero desplazamiento hacia el rojo (máximo a los 340 nm) y una mayor intensidad de fluorescencia. Esta diferencia podría estar relacionada con la presencia de HMWA en esta muestra, los que se encuentran ausentes (o en cantidades despreciables) en los otros lotes. Por otro lado, luego del tratamiento con urea 6 M (rojo), DTT 100 mM (verde) y calor (amarillo), se observó un marcado desplazamiento hacia el rojo, con un máximo alrededor de los

360 nm, y un aumento de la intensidad de fluorescencia para la rbFSH (Figura 61B), la rbFSH-LD de la línea (Figura 61C) y la rbFSH-LD del clon (Figura 61D), lo cual es consistente con un estado de desnaturalización proteica (247,248).

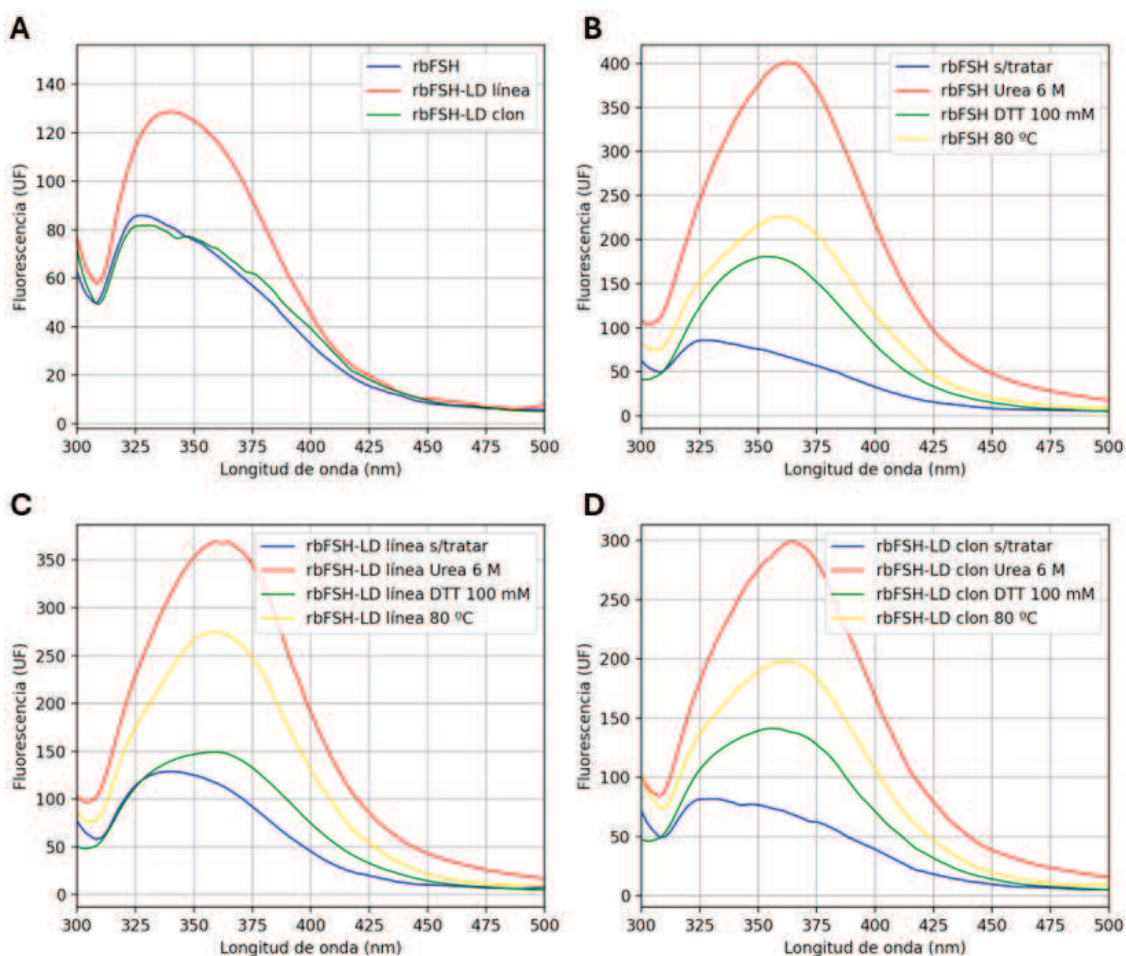


Figura 61. Espectros de emisión de fluorescencia de los lotes de las variantes de rbFSH. (A) Perfiles de rbFSH (azul), rbFSH-LD de línea (rojo) y rbFSH-LD del clon (verde) sin tratamiento. (B) rbFSH sin tratamiento (azul), con urea 6 M (rojo), con DTT 100 mM (verde) y calentada 1 h 80 °C (amarillo). (C) rbFSH-LD de línea sin tratamiento (azul), con urea 6 M (rojo), con DTT 100 mM (verde) y calentada 1 h 80 °C (amarillo). (D) rbFSH-LD del clon sin tratamiento (azul), con urea 6 M (rojo), con DTT 100 mM (verde) y calentada 1 h 80 °C (amarillo).

5.1.5. Espectroscopía de dicroísmo circular (CD)

La espectroscopía de dicroísmo circular (CD) es un método excelente para evaluar de forma rápida la estructura secundaria, el plegamiento y las propiedades de unión de las proteínas (249). En el UV lejano, el enlace peptídico es el principal grupo absorbente y permite la identificación de elementos estructurales secundarios, como hélices alfa, hojas beta y estructuras desordenadas (*“random coils”*). En el UV cercano, la absorción proviene de las cadenas laterales de aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr y Trp), proporcionando un espectro tipo huella dactilar que es altamente específico y característico de cada proteína (228,250,251).

Las estructuras secundarias y terciarias de las variantes de rbFSH fueron estudiadas mediante espectroscopía CD. Las variantes rbFSH y rbFSH-LD del clon presentaron espectros en la región del UV lejano característicos de proteínas compuestas por láminas beta y otras estructuras desordenadas (Figura 62). La diferencia de intensidades presente en los espectros de las hormonas podría ser el resultado de un mayor contenido de estructuras desordenadas en la variante rbFSH-LD debido a la presencia de las copias del péptido mGMOP, rico en Pro y Thr. Este tipo de estructuras suelen manifestarse como una banda fuertemente negativa en la región 195-200 nm y una banda más débil, que puede ser positiva o negativa, en la región 215-230 nm (252). Por otro lado, los espectros de ambas variantes en la región del UV cercano (Figura 63) resultaron comparables entre sí. En ambas regiones, los espectros obtenidos coincidieron con lo reportado por Groen y col. (246) para rhFSH, lo que indica que las variantes de rbFSH poseen estructuras secundarias y terciarias similares a las de la rhFSH.

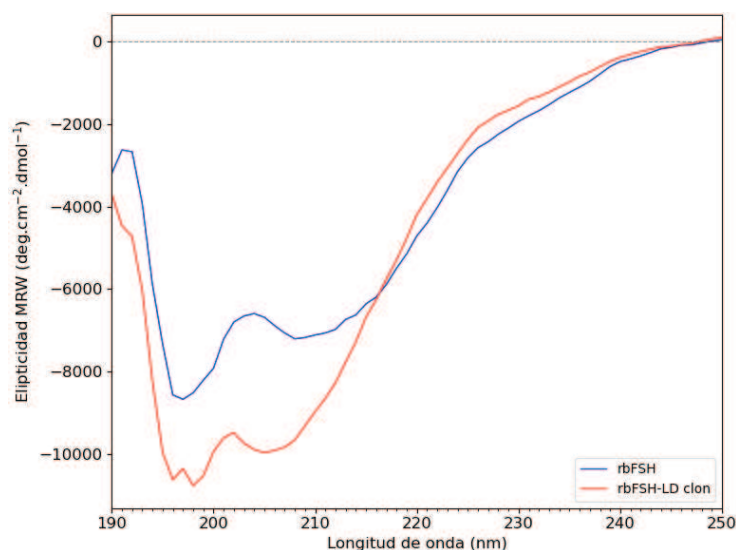


Figura 62. Espectro de CD en el UV lejano (190-250 nm) de las variantes de rbFSH. Se detallan los espectros de la rbFSH (azul) y rbFSH-LD producida por el clon P8D3 (rojo).

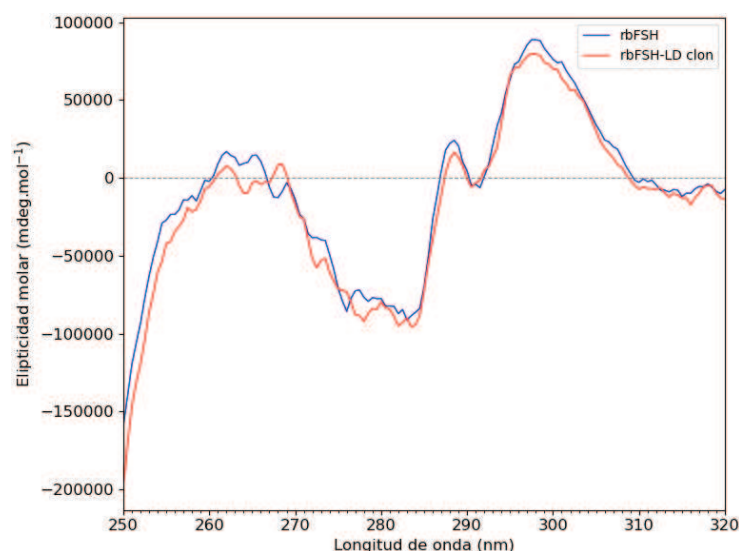


Figura 63. Espectro de CD en el UV cercano (250-320 nm) de las variantes de rbFSH. Se detallan los espectros de la rbFSH (azul) y rbFSH-LD producida por el clon P8D3 (rojo).

5.1.6. SEC-HPLC

El perfil cromatográfico de los lotes de las variantes de rbFSH fue analizado mediante SEC-HPLC, utilizando la metodología puesta a punto en la sección 1.5.2 (Figura 64). Mediante esta técnica, se determinó que las variantes de rbFSH presentaron un contenido de dímero y subunidades libres comparable al observado por SDS-PAGE (sección 5.1.1). No obstante, a diferencia de esta última metodología, la SEC-HPLC permitió detectar una pequeña cantidad de HMWA tanto en la rbFSH (1,3%) como en la rbFSH-LD obtenida a partir del clon P8D3 (1,0%) (Tabla 22), lo que demuestra su sensibilidad y eficacia para el análisis de agregados de rbFSH.

Tabla 22. Pureza y porcentaje relativo de dímero y subunidades libres presentes en los lotes de las variantes de rbFSH, obtenidos mediante SEC-HPLC

	rbFSH	rbFSH-LD línea	rbFSH-LD clon
Pureza (%)	> 99	>99	>99
HMWA (%)	1,3	6,4	1,0
Dímero (%)	76,5	68,8	77,3
Subunidades* (%)	22,2	24,8	21,6

* Suma de subunidades α y β libres

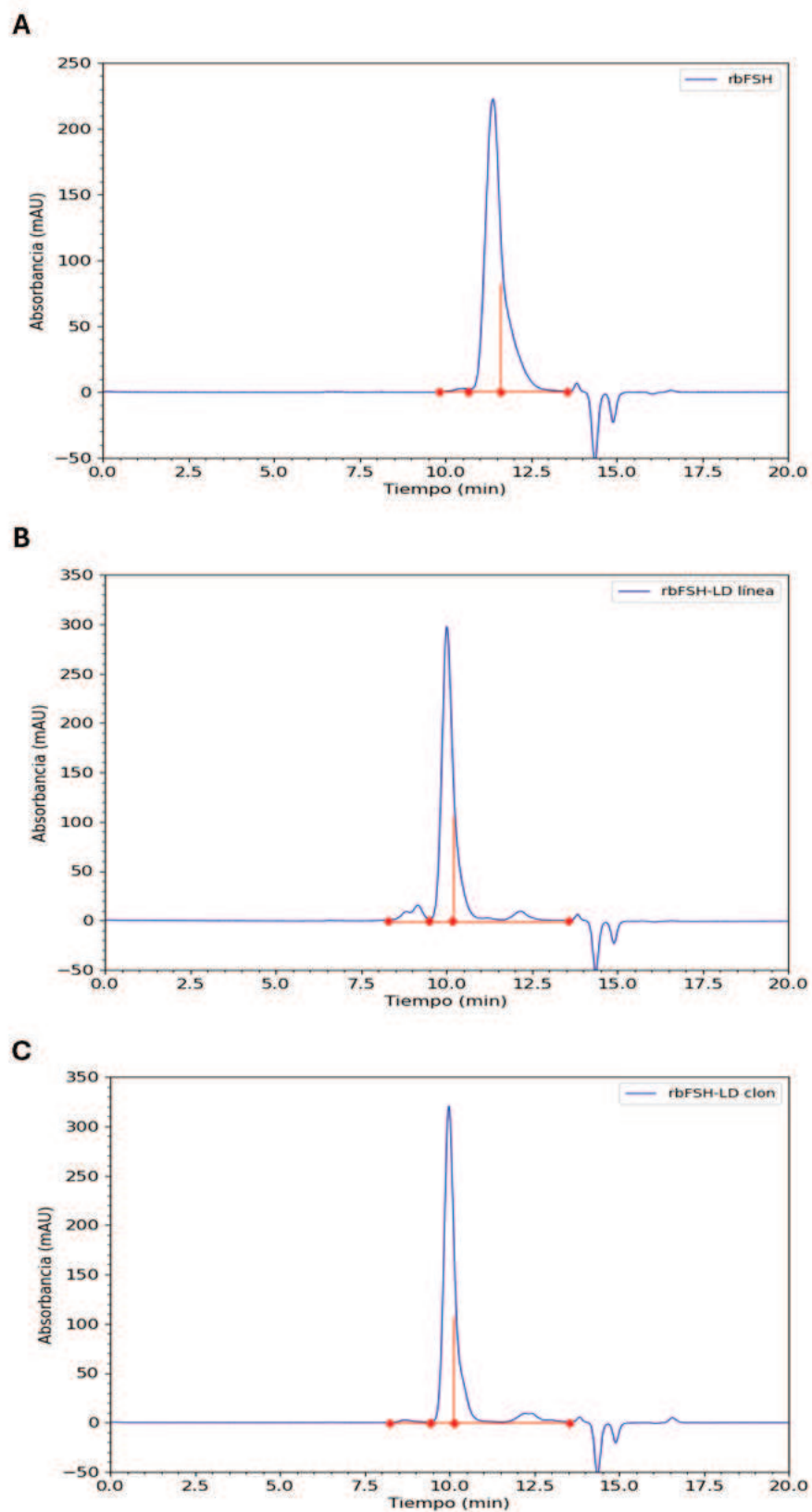


Figura 64. Perfil de SEC-HPLC de rbFSH (A), rbFSH-LD producida por la línea celular (B) y rbFSH-LD producida por el clon (C). Como fase móvil se utilizó buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 7 con el agregado de arginina 200 mM.

5.2. Caracterización biológica

5.2.1. Determinación de la potencia biológica *in vivo*

Como paso previo a la realización de ensayos en animales de destino, se evaluó la potencia biológica de la rbFSH-LD purificada a partir del clon P8D3, mediante el ensayo recomendado por la Farmacopea Europea. La actividad biológica específica (ABE) estimada para esta muestra fue similar a la obtenida para la rbFSH-LD purificada a partir de la línea celular (9930 UI.mg⁻¹ vs 10000 UI.mg⁻¹, respectivamente). En este sentido, tanto la ABE de la rbFSH-LD como la de la rbFSH (4200 UI.mg⁻¹), fueron considerablemente mayores que la reportada por Abreu y col. (92) para una bFSH monocatenaria recombinante fusionada a un hCTP (scbFSH) producida en *L. tarentolae*. En comparación con dicha molécula, la rbFSH-LD presentó una ABE entre 177 y 225 veces mayor, lo que podría explicarse por su mayor contenido de glicanos y la consiguiente mejora en los parámetros farmacocinéticos. Considerando que los glicanos con alto contenido de manosa son las estructuras glicosídicas predominantes de la scbFSH producida por Abreu y col. y que *L. tarentolae* carece de sialiltransferasas (13), estos resultados enfatizan, una vez más, la importancia de un correcto patrón de glicosilación y, especialmente, un contenido adecuado de ácido siálico para obtener una actividad *in vivo* óptima.

5.2.2. Prueba de concepto en animales de destino

Los resultados de caracterización presentados en esta sección sugieren que las características fisicoquímicas y estructurales de la variante rbFSH-LD purificada a partir de la línea celular y del clon P8D3 son similares entre sí. Además, el hecho de que ambas presenten contenido de Neu5Ac y ABE comparables permite suponer que sus propiedades farmacocinéticas también serían equivalentes. No obstante, se optó por utilizar el lote de rbFSH-LD producido por el clon P8D3 para los ensayos de superovulación (SOV) en bovinos, no solo por presentar un contenido reducido de agregados de alto peso molecular (HMWA), sino también por las ventajas que representa el uso de un clon en términos del proceso productivo. En efecto, trabajar con un clon permite alcanzar una mayor homogeneidad en los niveles de expresión, en la calidad del producto recombinante, y en parámetros críticos como el crecimiento y el metabolismo celular. Estas características contribuyen a un proceso más controlado y reproducible, favoreciendo la obtención de un producto final de elevada consistencia.

El ensayo de SOV se llevó a cabo utilizando 180 µg de cada variante de rbFSH por animal, administradas en un esquema de 8 dosis de rbFSH (similar a los protocolos tradicionales de SOV) o una única dosis de rbFSH-LD. A su vez, se incluyó un grupo

control sin tratamiento con FSH. En la Tabla 23 se resumen las principales variables analizadas durante el protocolo. Tanto la rbFSH como la rbFSH-LD fueron capaces de inducir una respuesta SOV en comparación con el grupo control ($p < 0,05$). El número de ovocitos fecundados (OF) y no fecundados (ONF) fue similar entre los grupos tratados con las variantes recombinantes, mientras que el número de cuerpos lúteos (CL) y folículos anovulatorios (FAN) fue mayor en los animales tratados con rbFSH-LD en comparación con los que recibieron rbFSH. El número de embriones viables (EV) fue estadísticamente similar entre ambos tratamientos hormonales y consistente con los valores reportados previamente en la bibliografía para protocolos que emplean FSH porcina comercial, con una media de aproximadamente 6 EV por animal (85,147,253–255). Estos resultados demuestran que una única aplicación de rbFSH-LD fue capaz de generar una respuesta similar a 8 dosis de rbFSH. Más aún, los resultados fueron comparables a los reportados por Gutiérrez-Reinoso y col. (85), quienes utilizaron 170 µg de una rbFSH hiperglicosilada administrada en un esquema de 4 dosis decrecientes. No obstante, es importante aclarar que en este ensayo se evaluó una única dosis de cada hormona, seleccionada en función de su ABE y de las áreas bajo la curva de farmacocinética obtenidas en los ensayos en ratas. Por lo tanto, será necesario realizar futuros estudios para optimizar la dosis de rbFSH-LD en bovinos, con el fin de determinar la más efectiva para maximizar su efecto biológico. Aun así, estos resultados sugieren que sería posible reducir el número de dosis aplicadas, lo que contribuiría a disminuir el costo y mejorar la logística asociada a los tratamientos hormonales.

Tabla 23. Resultados de la prueba de concepto de superovulación (SOV) en bovinos tratados con diferentes variantes de rbFSH

	Protocolo SOV		
	Control (Media ± SEM)	rbFSH (Media ± SEM)	rbFSH-LD (Media ± SEM)
Cuerpos lúteos (CL)	1,4 ± 0,2 ^C	10,0 ± 3,0 ^B	17,0 ± 2,0 ^A
Folículos anovulatorios (FAN)	0,0 ± 0,0 ^B	0,0 ± 0,0 ^B	9,5 ± 0,5 ^A
Ovocitos no fecundados (ONF)	0,0 ± 0,0 ^B	2,0 ± 1,0 ^A	3,0 ± 3,0 ^A
Ovocitos fecundados (OF)	0,4 ± 0,2 ^B	5,0 ± 2,0 ^A	6,0 ± 3,0 ^A
Embriones viables (EV)	0,2 ± 0,2 ^B	5,0 ± 2,0 ^A	5,0 ± 2,0 ^A

Las letras diferentes dentro de la misma fila (A, B y C) representan diferencias estadísticas significativas entre los grupos ($p < 0.05$).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

La hiperestimulación ovárica bovina es un proceso que actualmente se basa en el uso de preparaciones de hormona folículo-estimulante (FSH) porcina, parcialmente purificadas a partir de glándulas pituitarias. Este producto presenta numerosas desventajas, como variaciones entre lotes, posible contaminación con LH, una vida media circulante extremadamente corta, riesgo de transmisión de enfermedades y potenciales efectos secundarios inmunológicos debido al uso repetido de preparaciones de FSH exógena (100,101,125,131–133,147,256,257). Se han reportado numerosos intentos de producir rFSH no humana en diferentes huéspedes. La rFSH producida en sistemas no mamíferos, como levaduras, células de insecto y células vegetales, presentó nula o muy baja actividad biológica *in vivo*, probablemente debido a su rápida eliminación de la circulación. Esto se atribuye a un perfil de glicosilación incorrecto, que podría generar un menor tamaño hidrodinámico como consecuencia de glicanos más pequeños o a la ausencia de ácidos siálicos terminales, facilitando la remoción de la proteína por parte de los receptores de asialoglicoproteínas (ASGPR) (135,136,138–143). En cambio, la rFSH producida en sistemas mamíferos ha demostrado una actividad biológica *in vivo* adecuada en ratas o en ganado (85,91,144–147), lo que confirma la importancia de un perfil de glicosilación adecuado. Desafortunadamente, la producción de rbFSH mediante tecnologías recombinantes suele ser más costosa que los métodos extractivos y, por esta razón, es necesario mejorar no solo la productividad del proceso, sino también la actividad biológica de la rFSH para reducir el número de dosis requeridas por animal.

En este trabajo, se describió el desarrollo de una nueva variante hiperglicosilada de rbFSH de larga duración (rbFSH-LD) producida en células sCHO-K1 cultivadas en SFM como un sustituto atractivo de la FSH porcina derivada de glándulas pituitarias, disponible comercialmente para uso veterinario.

Durante la primera etapa, se diseñó una variante recombinante de la hormona folículo-estimulante bovina de larga duración (rbFSH-LD), mediante la fusión de tres copias de la secuencia codificante del péptido mGMOP al extremo C de la subunidad β de la FSH bovina, que aporta hasta 18 sitios potenciales de O-glicosilación. Además, se produjo la rbFSH nativa, es decir, sin modificar. Todas las subunidades (α , β y β -LD) fueron producidas fusionadas a etiquetas de histidina (His6) en su extremo C para facilitar su purificación. Mediante transgénesis lentiviral se generaron líneas celulares estables productoras de las variantes de rbFSH, que luego fueron adaptadas a crecimiento en suspensión en medio libre de suero fetal bovino (SFM) y cultivadas en

un biorreactor de 1 L de volumen de trabajo operado en modo de perfusión, utilizando un filtro tipo *spin* como dispositivo de retención celular.

Con el objetivo de contar con suficiente cantidad de las hormonas puras para iniciar los ensayos de caracterización, se optimizó un protocolo de purificación para ambas variantes de rbFSH. Para ello, se explotaron las ventajas que presenta la cromatografía de pseudoafinidad a iones metálicos inmovilizados (IMAC), desarrollándose un proceso de purificación consistente en un único paso cromatográfico empleando una resina IMAC acoplada a níquel (Ni^{2+}) como ion metálico inmovilizado y utilizando imidazol como agente de elución. El primer paso del desarrollo de este método consistió en hallar la concentración óptima de imidazol para las etapas de lavado y elución mediante una elución en gradiente. Posteriormente, se evaluaron las concentraciones halladas en la primera etapa y, finalmente, se purificó el resto de las cosechas del biorreactor mediante el protocolo optimizado. El rendimiento global de los procesos de purificación fue cercano al 70%, con una pureza superior al 99% para ambas hormonas. Las fracciones de elución de cada proteína fueron concentradas y diafiltradas contra tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7,4 y, posteriormente, se realizaron ensayos de caracterización fisicoquímicos y biológicos.

El análisis de las proteínas purificadas mediante SDS-PAGE demostró la presencia del dímero y trazas de subunidades libres en ambas hormonas. Asimismo, la rbFSH-LD presentó una masa molecular aparente mayor a la correspondiente a rbFSH. La identidad de cada una de las bandas se confirmó mediante un ensayo de *western blot*, utilizando tanto un pAb anti-rbFSH como un mAb anti-hFSH β como anticuerpos de detección. Por otro lado, ensayos de isoelectroenfoque (IEF) evidenciaron la presencia de un mayor número de glicofomas en la rbFSH-LD, con predominio de isoformas más ácidas debido al mayor contenido de ácido siálico (4 veces superior) respecto a la variante sin modificar. El estudio farmacocinético de las hormonas purificadas demostró que la incorporación de los nuevos sitios de O-glicosilación modificó el perfil de absorción de la rbFSH-LD, observándose además una disminución de su *clearance* plasmático y un aumento de su permanencia en circulación. Más aún, la rbFSH-LD presentó una actividad biológica específica 2,4 veces superior a la rbFSH en ratas. En función de estos resultados, la variante rbFSH-LD fue seleccionada para avanzar con el desarrollo clones celulares, con el objetivo de estandarizar el proceso de producción.

Luego del clonado de la línea celular productora de rbFSH-LD, se seleccionaron tres clones (P7F4, P8D3 y P8D6) en función de su productividad y perfil electroforético para su adaptación a SFM. El clon P8D3, que exhibió la mayor productividad y velocidad específica de crecimiento, fue cultivado en un biorreactor, purificándose la rbFSH-LD mediante cromatografía IMAC en una única etapa, con una pureza superior al 99% y un

rendimiento global del 65%. El perfil electroforético mostró una alta proporción de dímero (70–87%) y mínimos niveles de agregados de alto peso molecular (HMWA) (alrededor de 1%), lo que avala la factibilidad del proceso para su futura implementación a mayor escala.

La rbFSH-LD producida por el clon P8D3 fue caracterizada estructural y funcionalmente en comparación con la hormona no modificada. Mediante dicroísmo circular, se observó que ambas variantes presentaron características estructurales similares, con predominio de láminas beta y otras estructuras desordenadas. No obstante, la diferencia de intensidades sugiere un posible incremento del contenido de estructuras desordenadas en la variante rbFSH-LD, atribuible a la presencia del péptido mGMOP, rico en Pro y Thr. Por otra parte, la variante hiperglicosilada exhibió una actividad biológica específica cercana a $10000 \text{ UI} \cdot \text{mg}^{-1}$, la cual resultó 2,4 veces superior a la observada para la rbFSH. Finalmente, en una prueba de concepto en vacas, una única dosis de $180 \mu\text{g}$ de rbFSH-LD generó una respuesta de superovulación (SOV) similar a $180 \mu\text{g}$ de rbFSH distribuidos en 8 dosis. Si bien es necesario realizar un estudio más detallado para determinar la dosis efectiva, estos resultados sugieren la factibilidad de reducir la frecuencia de administración de la rbFSH-LD, disminuyendo tanto el costo de los tratamientos como los inconvenientes asociados al manejo y traslado diario del ganado que implica su aplicación repetida.

Adicionalmente, a lo largo de este trabajo y de forma paralela a las actividades descritas, fue necesario desarrollar diversas técnicas analíticas para la detección, caracterización e identificación de las variantes de rbFSH. En este sentido, se desarrollaron anticuerpos policlonales mediante un protocolo de inoculación de la variante rbFSH en conejos. Estos anticuerpos permitieron no solo la detección e identificación de las hormonas en diferentes muestras, sino también el desarrollo de un ELISA sándwich para la cuantificación de las proteínas. Por otro lado, se optimizó una metodología de IEF para la evaluación del perfil glicosídico de las variantes de rbFSH y se desarrolló una técnica de SEC-HPLC para el análisis del contenido de HMWA de las proteínas purificadas.

En resumen, la estrategia descrita en este trabajo permitió desarrollar los primeros pasos de un sistema de producción de una nueva variante hiperglicosilada de rbFSH recombinante, con mayor actividad biológica *in vivo*, parámetros farmacocinéticos mejorados y ausencia de actividad de LH, lo que representa una alternativa atractiva al uso de preparados comerciales de FSH porcina derivada de glándulas pituitarias.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Szkodny AC, Lee KH. Biopharmaceutical Manufacturing: Historical Perspectives and Future Directions. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*. 2022;13(Volume 13, 2022): 141–165. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-092220-125832>.
2. Rader RA. (Re)defining biopharmaceutical. *Nature Biotechnology*. 2008;26(7): 743–751. <https://doi.org/10.1038/nbt0708-743>.
3. Walsh G. Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. *Drug Discovery Today*. 2010;15(17): 773–780. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2010.06.009>.
4. *Biopharmaceuticals Market Size | Mordor Intelligence*. <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/global-biopharmaceuticals-market-industry> [Accessed 19th April 2025].
5. Carton JM, Strohl WR. Chapter 4 - Protein therapeutics (introduction to biopharmaceuticals). In: Ganellin R, Roberts S, Jefferis R (eds) *Introduction to Biological and Small Molecule Drug Research and Development*. Oxford: Elsevier; 2013. p. 127–159. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397176-0.00004-2>. [Accessed 19th April 2025].
6. Jayakrishnan A, Wan Rosli WR, Tahir ARM, Razak FSA, Kee PE, Ng HS, et al. Evolving Paradigms of Recombinant Protein Production in Pharmaceutical Industry: A Rigorous Review. *Sci*. 2024;6(1): 9. <https://doi.org/10.3390/sci6010009>.
7. Tripathi NK, Shrivastava A. Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2019;7. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00420>.
8. O'Flaherty R, Bergin A, Flampouri E, Mota LM, Obaidi I, Quigley A, et al. Mammalian cell culture for production of recombinant proteins: A review of the critical steps in their biomanufacturing. *Biotechnology Advances*. 2020;43(March): 107552. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107552>.
9. Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*. 2009;27(3): 297–306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.008>.
10. Kyratsous CA, Panagiotidis CA. Heat-shock protein fusion vectors for improved expression of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*. 2012;824: 109–129. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-433-9_5.
11. Hamilton SR, Bobrowicz P, Bobrowicz B, Davidson RC, Li H, Mitchell T, et al. Production of Complex Human Glycoproteins in Yeast. *Science*. 2003;301(5637): 1244–1246. <https://doi.org/10.1126/science.1088166>.
12. Hollister J, Grabenhorst E, Nimtz M, Conradt H, Jarvis DL. Engineering the Protein N-Glycosylation Pathway in Insect Cells for Production of Biantennary, Complex N-Glycans. *Biochemistry*. 2002;41(50): 15093–15104. <https://doi.org/10.1021/bi026455d>.
13. De Oliveira TA, Silva WD, Da Rocha Torres N, Badaró De Moraes JV, Senra RL, De Oliveira Mendes TA, et al. Application of the LEXSY *Leishmania tarentolae* system as a recombinant protein expression platform: A review. *Process Biochemistry*. 2019;87: 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.08.019>.

14. Bosch D, Castilho A, Loos A, Schots A, Steinkellner H. N-glycosylation of plant-produced recombinant proteins. *Current Pharmaceutical Design*. 2013;19(31): 5503–5512. <https://doi.org/10.2174/1381612811319310006>.
15. Lindskog EK, Fischer S, Wenger T, Schulz P. Chapter 6 - Host Cells. In: Jagschies G, Lindskog E, Łacki K, Galliher P (eds) *Biopharmaceutical Processing*. Elsevier; 2018. p. 111–130. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100623-8.00006-2>. [Accessed 20th April 2025].
16. Luitjens A, van Corven E. Production and Purification of Recombinant Proteins. In: Crommelin DJA, Sindelar RD, Meibohm B (eds) *Pharmaceutical Biotechnology: Fundamentals and Applications*. Cham, Switzerland: Springer International Publishing; 2024. p. 69–94. https://doi.org/10.1007/978-3-031-30023-3_4. [Accessed 24th January 2025].
17. Bielser JM, Wolf M, Souquet J, Broly H, Morbidelli M. Perfusion mammalian cell culture for recombinant protein manufacturing – A critical review. *Biotechnology Advances*. 2018;36(4): 1328–1340. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.04.011>.
18. Matanguihan C, Wu P. Upstream continuous processing: recent advances in production of biopharmaceuticals and challenges in manufacturing. *Current Opinion in Biotechnology*. 2022;78: 102828. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2022.102828>.
19. Bandaranayake AD, Almo SC. Recent advances in mammalian protein production. *FEBS Letters*. 2014;588(2): 253–260. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.11.035>.
20. Bollati-Fogolín M, Comini M. Cloning and expression of heterologous proteins in animal cells. In: *Animal Cell Technology*. Taylor & Francis; 2008.
21. Fus-Kujawa A, Prus P, Bajdak-Rusinek K, Teper P, Gawron K, Kowalczyk A, et al. An Overview of Methods and Tools for Transfection of Eukaryotic Cells in vitro. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2021;9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.701031>.
22. Gutiérrez-Granados S, Cervera ,Laura, Kamen ,Amine A., and Gòdia F. Advancements in mammalian cell transient gene expression (TGE) technology for accelerated production of biologics. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2018;38(6): 918–940. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1419459>.
23. Baranyi L, Roy A, Embree HD, Dropulic B. Lentiviral Vector–Mediated Genetic Modification of Cell Substrates for the Manufacture of Proteins and Other Biologics. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 2010;64(5): 379–385.
24. Delenda C. Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. *The Journal of Gene Medicine*. 2004;6(S1): S125–S138. <https://doi.org/10.1002/jgm.501>.
25. Sakuma T, Barry MA, Ikeda Y. Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochemical Journal*. 2012;443(3): 603–618. <https://doi.org/10.1042/BJ20120146>.
26. Merten OW, Hebben M, Bovolenta C. Production of lentiviral vectors. *Molecular Therapy Methods & Clinical Development*. 2016;3. <https://doi.org/10.1038/mtm.2016.17>.
27. Kannicht C, [ed.]. *Post-Translational Modification of Proteins: Tools for Functional Proteomics*. New York, NY: Springer; 2019. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9055-9>. [Accessed 2nd May 2025].

28. Higgins S, Hames B. *Post-translational Processing: A Practical Approach*. OUP Oxford; 1999.
29. Costa AR, Rodrigues ME, Henriques M, Oliveira R, Azeredo J. Glycosylation: impact, control and improvement during therapeutic protein production. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2014;34(4): 281–299. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.793649>.
30. Dicker M, and Strasser R. Using glyco-engineering to produce therapeutic proteins. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2015;15(10): 1501–1516. <https://doi.org/10.1517/14712598.2015.1069271>.
31. Stanley P, Taniguchi N, Aebi M. N-Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, et al. (eds) *Essentials of Glycobiology*. 3rd edn Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453020/> [Accessed 2nd May 2025].
32. Thompson N, Wakarchuk W. O-glycosylation and its role in therapeutic proteins. *Bioscience Reports*. 2022;42(10): BSR20220094. <https://doi.org/10.1042/BSR20220094>.
33. Brockhausen I, Stanley P. O-GalNAc Glycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, et al. (eds) *Essentials of Glycobiology*. 3rd edn Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK453030/> [Accessed 2nd May 2025].
34. Higel F, Sandl T, Kao CY, Pechinger N, Sörgel F, Friess W, et al. N-glycans of complex glycosylated biopharmaceuticals and their impact on protein clearance. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2019;139: 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.03.018>.
35. Geyer H, Geyer R. Strategies for analysis of glycoprotein glycosylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 2006;1764(12): 1853–1869. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2006.10.007>.
36. Butler M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005;68(3): 283–291. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1980-8>.
37. Walsh G, Jefferis R. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nature Biotechnology*. 2006;24(10): 1241–1252. <https://doi.org/10.1038/nbt1252>.
38. Zhu J. Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production. *Biotechnology Advances*. 2012;30(5): 1158–1170. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.022>.
39. Sinclair AM, Elliott S. Glycoengineering: The effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005;94(8): 1626–1635. <https://doi.org/10.1002/jps.20319>.
40. Solá RJ, Griebenow K. Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009;98(4): 1223–1245. <https://doi.org/10.1002/jps.21504>.
41. Shental-Bechor D, Levy Y. Effect of glycosylation on protein folding: A close look at thermodynamic stabilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(24): 8256–8261. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801340105>.
42. Solá RJ, Griebenow K. Glycosylation of Therapeutic Proteins. *BioDrugs*. 2010;24(1): 9–21. <https://doi.org/10.2165/11530550-000000000-00000>.

43. Dammen-Brower K, Epler P, Zhu S, Bernstein ZJ, Stabach PR, Braddock DT, et al. Strategies for Glycoengineering Therapeutic Proteins. *Frontiers in Chemistry*. 2022;10. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.863118>.
44. Goochee CF, Gramer MJ, Andersen DC, Bahr JB, Rasmussen JR. The oligosaccharides of glycoproteins: bioprocess factors affecting oligosaccharide structure and their effect on glycoprotein properties. *Bio/technology (Nature Publishing Company)*. 1991;9(12): 1347–1355. <https://doi.org/10.1038/nbt1291-1347>.
45. Baenziger JU. Glycosylation: to what end for the glycoprotein hormones? *Endocrinology*. 1996;137(5): 1520–1522. <https://doi.org/10.1210/endo.137.5.8612480>.
46. Ashwell G, Harford J. Carbohydrate-Specific Receptors of the Liver. *Annual Review of Biochemistry*. 1982;51(Volume 51, 1982): 531–554. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.51.070182.002531>.
47. Fiete D, Srivastava V, Hindsgaul O, Baenziger JU. A hepatic reticuloendothelial cell receptor specific for SO₄-4GalNAc beta 1,4GlcNAc beta 1,2Man alpha that mediates rapid clearance of lutropin. *Cell*. 1991;67(6): 1103–1110. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90287-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90287-9).
48. Fiete D, Baenziger JU. Isolation of the SO₄-4-GalNAc β 1,4GlcNAc β 1,2Man α -specific Receptor from Rat Liver *. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(23): 14629–14637. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.23.14629>.
49. Davis JS, Kumar TR, May JV, Bousfield GR. Naturally Occurring Follicle-Stimulating Hormone Glycosylation Variants. *Journal of glycomics & lipidomics*. 2014;4(1): e117. <https://doi.org/10.4172/2153-0637.1000e117>.
50. Ulloa-Aguirre A, Reiter E, Crepieux P. FSH receptor signaling: Complexity of interactions and signal diversity. *Endocrinology*. 2018;159(8): 3020–3035. <https://doi.org/10.1210/EN.2018-00452>.
51. Bousfield GR, Butnev VY, Butnev VY, Hiromasa Y, Harvey DJ, May JV. Hypo-glycosylated human follicle-stimulating hormone (hFSH21/18) is much more active in vitro than fully-glycosylated hFSH (hFSH24). *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2014;382(2): 989–997. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2013.11.008>.
52. Dias JA, Ulloa-Aguirre A. New Human Follitropin Preparations: How Glycan Structural Differences May Affect Biochemical and Biological Function and Clinical Effect. *Frontiers in Endocrinology*. 2021;12. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2021.636038>.
53. Lisowska E. The role of glycosylation in protein antigenic properties. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. 2002;59(3): 445–455. <https://doi.org/10.1007/s00018-002-8437-3>.
54. Varki A. Biological roles of glycans. *Glycobiology*. 2017;27(1): 3–49. <https://doi.org/10.1093/glycob/cww086>.
55. Delgado C, Francis GE, Fisher D. The uses and properties of PEG-linked proteins. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 1992;9(3–4): 249–304.
56. Sytkowski AJ, Lunn ED, Davis KL, Feldman L, Siekman S. Human erythropoietin dimers with markedly enhanced in vivo activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(3): 1184–1188. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.3.1184>.

57. Sytkowski AJ, Lunn ED, Risinger MA, Davis KL. An Erythropoietin Fusion Protein Comprised of Identical Repeating Domains Exhibits Enhanced Biological Properties *. *Journal of Biological Chemistry*. 1999;274(35): 24773–24778. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.35.24773>.
58. Dalle B, Henri A, Rouyer-Fessard P, Bettan M, Scherman D, Beuzard Y, et al. Dimeric erythropoietin fusion protein with enhanced erythropoietic activity in vitro and in vivo. *Blood*. 2001;97(12): 3776–3782. <https://doi.org/10.1182/blood.V97.12.3776>.
59. Furuhashi M, Shikone T, Fares FA, Sugahara T, Hsueh AJ, Boime I. Fusing the carboxy-terminal peptide of the chorionic gonadotropin (CG) beta-subunit to the common alpha-subunit: retention of O-linked glycosylation and enhanced in vivo bioactivity of chimeric human CG. *Molecular Endocrinology*. 1995;9(1): 54–63. <https://doi.org/10.1210/mend.9.1.7539107>.
60. Kuai L tian, Wu C lei, Qiu Q feng, Zhang J, Zhou A wu, Wang S quan, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 fused with erythropoietin (EPO) mimetic peptide (EMP) enhances the EPO activity of EMP. *The Journal of Peptide Research*. 2000;56(2): 59–62. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3011.2000.00716.x>.
61. Sheffield WP, Marques JA, Bhakta V, Smith IJ. Modulation of Clearance of Recombinant Serum Albumin by Either Glycosylation or Truncation. *Thrombosis Research*. 2000;99(6): 613–621. [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(00\)00286-3](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(00)00286-3).
62. Moreland LW. SOLUBLE TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR (p75) FUSION PROTEIN (ENBREL) AS A THERAPY FOR RHEUMATOID ARTHRITIS. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 1998;24(3): 579–591. [https://doi.org/10.1016/S0889-857X\(05\)70027-2](https://doi.org/10.1016/S0889-857X(05)70027-2).
63. Francis GE, Fisher D, Delgado C, Malik F, Gardiner A, Neale D. PEGylation of cytokines and other therapeutic proteins and peptides: the importance of biological optimisation of coupling techniques. *International journal of hematology*. 1998;68(1): 1–18. [https://doi.org/10.1016/s0925-5710\(98\)00039-5](https://doi.org/10.1016/s0925-5710(98)00039-5).
64. Coscarella A, Liddi R, Di Loreto M, Bach S, Faiella A, van der Meide PH, et al. THE rhGM-CSF–EPO HYBRID PROTEIN MEN 11300 INDUCES ANTI-EPO ANTIBODIES AND SEVERE ANAEMIA IN RHESUS MONKEYS. *Cytokine*. 1998;10(12): 964–969. <https://doi.org/10.1006/cyto.1998.0384>.
65. Gribben JG, Devereux S, Thomas NSB, Keim M, Jones HM, Goldstone AH, et al. Development of antibodies to unprotected glycosylation sites on recombinant human GM-CSF. *The Lancet*. 1990;335(8687): 434–437. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)90665-R](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)90665-R).
66. Jefferis R. Glycosylation as a strategy to improve antibody-based therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2009;8(3): 226–234. <https://doi.org/10.1038/nrd2804>.
67. Hossler P. Protein Glycosylation Control in Mammalian Cell Culture: Past Precedents and Contemporary Prospects. In: Hu WS, Zeng AP (eds) *Genomics and Systems Biology of Mammalian Cell Culture*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2012. p. 187–219. https://doi.org/10.1007/10_2011_113. [Accessed 4th May 2025].
68. St. Amand MM, Radhakrishnan D, Robinson AS, Ogunnaike BA. Identification of manipulated variables for a glycosylation control strategy. *Biotechnology and Bioengineering*. 2014;111(10): 1957–1970. <https://doi.org/10.1002/bit.25251>.

69. Xu X, Nagarajan H, Lewis NE, Pan S, Cai Z, Liu X, et al. The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line. *Nature Biotechnology*. 2011;29(8): 735–741. <https://doi.org/10.1038/nbt.1932>.
70. Lewis NE, Liu X, Li Y, Nagarajan H, Yerganian G, O'Brien E, et al. Genomic landscapes of Chinese hamster ovary cell lines as revealed by the *Cricetulus griseus* draft genome. *Nature Biotechnology*. 2013;31(8): 759–765. <https://doi.org/10.1038/nbt.2624>.
71. Thaysen-Andersen M, Packer NH. Site-specific glycoproteomics confirms that protein structure dictates formation of N-glycan type, core fucosylation and branching. *Glycobiology*. 2012;22(11): 1440–1452. <https://doi.org/10.1093/glycob/cws110>.
72. Lim Y, Wong NSC, Lee YY, Ku SCY, Wong DCF, Yap MGS. Engineering mammalian cells in bioprocessing - current achievements and future perspectives. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2010;55(4): 175–189. <https://doi.org/10.1042/BA20090363>.
73. Restelli V, Butler M. The Effect of Cell Culture Parameters on Protein Glycosylation. In: Al-Rubeai M (ed.) *Cell Engineering: Glycosylation*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2002. p. 61–92. https://doi.org/10.1007/0-306-47525-1_2. [Accessed 4th May 2025].
74. Wang LX, Lomino JV. Emerging technologies for making glycan-defined glycoproteins. *ACS chemical biology*. 2012;7(1): 110–122. <https://doi.org/10.1021/cb200429n>.
75. Egrie JC, Dwyer E, Browne JK, Hitz A, Lykos MA. Darbepoetin alfa has a longer circulating half-life and greater in vivo potency than recombinant human erythropoietin. *Experimental Hematology*. 2003;31(4): 290–299. [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(03\)00006-7](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(03)00006-7).
76. Elliott S, Lorenzini T, Asher S, Aoki K, Brankow D, Buck L, et al. Enhancement of therapeutic protein in vivo activities through glycoengineering. *Nature Biotechnology*. 2003;21(4): 414–421. <https://doi.org/10.1038/nbt799>.
77. Bürgi M, Aparicio GI, Dorella A, Kratje R, Scorticati C, Oggero M. Novel erythropoietin-based therapeutic candidates with extra N-glycan sites that block hematopoiesis but preserve neuroplasticity. *Biotechnology Journal*. 2021;16(5): 2000455. <https://doi.org/10.1002/biot.202000455>.
78. Ceaglio N, Etcheverrigaray M, Kratje R, Oggero M. Novel long-lasting interferon alpha derivatives designed by glycoengineering. *Biochimie*. 2008;90(3): 437–449. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.10.013>.
79. Song K, Yoon IS, Kim NA, Kim DH, Lee J, Lee HJ, et al. Glycoengineering of Interferon- β 1a Improves Its Biophysical and Pharmacokinetic Properties. *PLOS ONE*. 2014;9(5): e96967. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096967>.
80. Samoudi M, Minuchehr Z, Harcum SW, Tabandeh F, Omid Yeganeh N, Khodabandeh M. Rational design of glycoengineered interferon- β analogs with improved aggregation state: experimental validation. *Protein Engineering, Design and Selection*. 2017;30(1): 23–30. <https://doi.org/10.1093/protein/gzw058>.
81. Oggero M, Ceaglio N. Ingeniería de proteínas terapéuticas mediante hiperglicosilación en células de mamíferos. In: Forno G, Oggero M (eds) *Glicoproteínas terapéuticas*. Santa Fe, Argentina: Ediciones UNL; 2021.
82. Gugliotta A, Ceaglio N, Kratje R, Oggero M. Effect of ANITVNITV peptide fusion on the bioactivity and pharmacokinetics of human IFN- α 2b and a hyper-N-

- glycosylated variant. *Journal of Biotechnology*. 2019;303: 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.07.006>.
83. Perlman S, van den Hazel B, Christiansen J, Gram-Nielsen S, Jeppesen CB, Andersen KV, et al. Glycosylation of an N-Terminal Extension Prolongs the Half-Life and Increases the in Vivo Activity of Follicle Stimulating Hormone. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2003;88(7): 3227–3235. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-021201>.
 84. Ruman JI, Pollak S, Trousdale RK, Klein J, Lustbader JW. Effects of long-acting recombinant human follicle-stimulating hormone analogs containing N-linked glycosylation on murine folliculogenesis. *Fertility and Sterility*. 2005;83(4 SUPPL.): 1303–1309. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.12.027>.
 85. Gutiérrez-Reinoso MA, Aguilera CJ, Navarrete F, Cabezas J, Castro FO, Cabezas I, et al. Effects of Extra-Long-Acting Recombinant Bovine FSH (bscrFSH) on Cattle Superovulation. *Animals*. 2022;12(2): 173. <https://doi.org/10.3390/ANI12020153>.
 86. Ceaglio N, Gugliotta A, Tardivo MB, Cravero D, Etcheverrigaray M, Kratje R, et al. Improvement of in vitro stability and pharmacokinetics of hIFN- α by fusing the carboxyl-terminal peptide of hCG β -subunit. *Journal of Biotechnology*. 2016;221: 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.01.018>.
 87. Pierce JG, Parsons TF. Glycoprotein hormones: Structure and function. *Annual Review of Biochemistry*. 1981;Vol. 50: 465–495. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BI.50.070181.002341>.
 88. Cole LA, Khanlian SA. Hyperglycosylated hCG: A variant with separate biological functions to regular hCG. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2007;260–262: 228–236. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.03.047>.
 89. Fares FA, Suganuma N, Nishimori K, LaPolt PS, Hsueh AJW, Boime I. Design of a long-acting follitropin agonist by fusing the C-terminal sequence of the chorionic gonadotropin β subunit to the follitropin β subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(10): 4304–4308. <https://doi.org/10.1073/PNAS.89.10.4304>.
 90. Trousdale RK, Yu B, Pollak SV, Husami N, Vidali A, Lustbader JW. Efficacy of native and hyperglycosylated follicle stimulating hormone analogues for promoting fertility in female mice. *Fertility and sterility*. 2009;91(1): 265. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2007.11.013>.
 91. Kazeto Y, Suzuki H, Ozaki Y, Gen K. C-terminal peptide (hCTP) of human chorionic gonadotropin enhances in vivo biological activity of recombinant Japanese eel follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone produced in FreeStyle 293-F cell lines. *General and Comparative Endocrinology*. 2021;306. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2021.113731>.
 92. Abreu C, Grunberg K, Bonilla M, Crispo M, Pantano S, Jaeschke J, et al. Expression and functional characterization of chimeric recombinant bovine follicle-stimulating hormone produced in *Leishmania tarentolae*. *Microbial Biotechnology*. 2024;17(4): e14444. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14444>.
 93. Joshi L, Murata Y, Wondisford FE, Szkudlinski MW, Desai R, Weintraub BD. Recombinant thyrotropin containing a beta-subunit chimera with the human chorionic gonadotropin-beta carboxy-terminus is biologically active, with a prolonged plasma half-life: role of carbohydrate in bioactivity and metabolic clearance. *Endocrinology*. 1995;136(9): 3839–3848. <https://doi.org/10.1210/endo.136.9.7544273>.

94. Fares F, Guy R, Bar-Ilan A, Felikman Y, Fima E. Designing a long-acting human growth hormone (hGH) by fusing the carboxyl-terminal peptide of human chorionic gonadotropin β -subunit to the coding sequence of hGH. *Endocrinology*. 2010;151(9): 4410–4417. <https://doi.org/10.1210/EN.2009-1431>.
95. Fares F, Ganem S, Hajouj T, Agai E. Development of a Long-Acting Erythropoietin by Fusing the Carboxyl-Terminal Peptide of Human Chorionic Gonadotropin β -Subunit to the Coding Sequence of Human Erythropoietin. *Endocrinology*. 2007;148(10): 5081–5087. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0026>.
96. Fares F, Havron A, Fima E. Designing a Long Acting Erythropoietin by Fusing Three Carboxyl-Terminal Peptides of Human Chorionic Gonadotropin β Subunit to the N-Terminal and C-Terminal Coding Sequence. *International Journal of Cell Biology*. 2011;2011: 1–7. <https://doi.org/10.1155/2011/275063>.
97. Sales M de los M, Kratje R, Oggero M, Ceaglio N. Bifunctional GM-CSF-derived peptides as tools for O-glycoengineering and protein tagging. *Journal of Biotechnology*. 2021;327: 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.12.016>.
98. Iturraspe F. *Glicoingeniería de IFN-alfa2B humano: producción de variantes terapéuticas altamente O-glicosiladas empleando un nuevo péptido derivado del GM-CSF humano*. [B.Sc.] [Santa Fe, Argentina]: Universidad Nacional del Litoral; 2019.
99. Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tríbulo R, et al. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*. 2002;57(1): 53–72. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00657-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00657-4).
100. Hesser M, Morris J, Gibbons J. Advances in Recombinant Gonadotropin Production for Use in Bovine Superovulation. *Reproduction in Domestic Animals*. 2011;46(5): 933–942. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01767.x>.
101. Bó GA, Mapletoft RJ. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology*. 2014;81(1): 38–48. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.020>.
102. Quérat B. Molecular evolution of the glycoprotein hormones in vertebrates. *Perspectives in Comparative Endocrinology*. 1994; 27–35.
103. Sherman GB, Wolfe MW, Farmerie TA, Clay CM, Threadgill DS, Sharp DC, et al. A single gene encodes the beta-subunits of equine luteinizing hormone and chorionic gonadotropin. *Molecular Endocrinology*. 1992;6(6): 951–959. <https://doi.org/10.1210/mend.6.6.1379674>.
104. Stewart F, Allen WR. The binding of FSH, LH and PMSG to equine gonadal tissues. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1979;27: 431–440.
105. Bousfield GR, Butnev VY, Gotschall RR, Baker VL, Moore WT. Structural features of mammalian gonadotropins. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 1996;125(1–2): 3–19. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(96\)03945-7](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(96)03945-7).
106. Fox KM, Dias JA, Van Roey P. Three-dimensional structure of human follicle-stimulating hormone. *Molecular Endocrinology*. 2001;15(3): 378–389. <https://doi.org/10.1210/MEND.15.3.0603>.
107. Ulloa-Aguirre A, Timossi C. Structure-function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor. *Human Reproduction Update*. 1998;4(3): 260–283. <https://doi.org/10.1093/HUMUPD/4.3.260>.

108. Laphorn AJ, Harris DC, Littlejohn A, Lustbader JW, Canfield RE, Machin KJ, et al. Crystal structure of human chorionic gonadotropin. *Nature*. 1994;369(6480): 455–461. <https://doi.org/10.1038/369455a0>.
109. Fan QR, Hendrickson WA. Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. *Nature*. 2005;433(7023): 269–277. <https://doi.org/10.1038/nature03206>.
110. Ruddon RW, Sherman SA, Bedows E. Protein folding in the endoplasmic reticulum: Lessons from the human chorionic gonadotropin β subunit. *Protein Science*. 1996;5(8): 1443–1452. <https://doi.org/10.1002/pro.5560050801>.
111. Bousfield GR, May JV, Davis JS, Dias JA, Kumar TR. In Vivo and In Vitro impact of carbohydrate variation on human follicle-stimulating hormone function. *Frontiers in Endocrinology*. 2018;9(MAY): 216. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2018.00216/BIBTEX>.
112. Ulloa-Aguirre A, Midgley AR, Beitins IZ, Padmanabhan V. Follicle-Stimulating Isohormones: Characterization and Physiological Relevance. *Endocrine Reviews*. 1995;16(6): 765–787. <https://doi.org/10.1210/edrv-16-6-765>.
113. Wide L, Eriksson K. Low-glycosylated forms of both FSH and LH play major roles in the natural ovarian stimulation. *Upsala Journal of Medical Sciences*. 2018;123(2): 100–108. <https://doi.org/10.1080/03009734.2018.1467983>.
114. Butnev VY, Butnev VY, May JV, Shuai B, Tran P, White WK, et al. Production, purification, and characterization of recombinant hFSH glycoforms for functional studies. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2015;405: 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.01.026>.
115. Walton WJ, Nguyen VT, Butnev VY, Singh V, Moore WT, Bousfield GR. Characterization of Human FSH Isoforms Reveals a Nonglycosylated β -Subunit in Addition to the Conventional Glycosylated β -Subunit. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2001;86(8): 3675–3685. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.8.7712>.
116. Wang H, Butnev V, Bousfield GR, Kumar TR. A human FSH β transgene encoding the double N-glycosylation mutant (Asn7 Δ Asn24 Δ) FSH β subunit fails to rescue Fshb null mice. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2016;426: 113–124. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.02.015>.
117. Bousfield GR, Harvey DJ. Follicle-Stimulating Hormone Glycobiology. *Endocrinology*. 2019;160(6): 1515–1535. <https://doi.org/10.1210/EN.2019-00001>.
118. Ulloa-Aguirre A, Llamas R, Dias JA. Follicle-Stimulating Hormone Sweetness: How Carbohydrate Structures Impact on the Biological Function of the Hormone. *Archives of Medical Research*. 2024;55(8): 103091. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2024.103091>.
119. Morell AG, Gregoriadis G, Scheinberg IH, Hickman J, Ashwell G. The Role of Sialic Acid in Determining the Survival of Glycoproteins in the Circulation. *Journal of Biological Chemistry*. 1971;246(5): 1461–1467. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)76994-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)76994-4).
120. Park EI, Manzella SM, Baenziger JU. Rapid clearance of sialylated glycoproteins by the asialoglycoprotein receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(7): 4597–4602. <https://doi.org/10.1074/JBC.M210612200>.
121. Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Damián-Matsumura P, Dias JA. Role of glycosylation in function of follicle-stimulating hormone. *Endocrine*. 1999;11(3): 205–215. <https://doi.org/10.1385/ENDO:11:3:205>.

122. Caltabiano G, Campillo M, De Leener A, Smits G, Vassart G, Costagliola S, et al. The specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. 2008;65(16): 2484–2492. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8002-9>.
123. Cole LA, Butler SA. *Human chorionic gonadotropin (hCG)*. 1st ed. London Burlington, MA: Elsevier; 2010.
124. Baruselli PS, de Abreu LÂ, Catussi BLC, Oliveira AC dos S, Rebeis LM, Gricio EA, et al. Use of new recombinant proteins for ovarian stimulation in ruminants. *Animal Reproduction*. 2023;20(2): e20230092. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2023-0092>.
125. Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, et al. Bovine embryo technologies. *Theriogenology*. 2003;59(2): 599–616. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01243-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01243-8).
126. Bó GA, Baruselli PS, Chesta PM, Martins CM. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology*. 2006;65(1): 89–101. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.10.008>.
127. Baruselli PS, de Sá Filho MF, Martins CM, Nasser LF, Nogueira MFG, Barros CM, et al. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*. 2006;65(1): 77–88. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.10.006>.
128. Baruselli PS, Martins CM, Sales JNS, Ferreira RM. Recent advances in bovine superovulation. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2008;36(2): S433–S448.
129. M. O. Marques LFN. Follicular dynamics and pregnancy rates in *Bos taurus* x *Bos indicus* embryo transfer recipients treated to increase plasma progesterone concentrations. *Follicular dynamics and pregnancy rates in Bos taurus x Bos indicus embryo transfer recipients treated to increase plasma progesterone concentrations*. 2012;9(2): 111–119.
130. Vieira LM, Rodrigues CA, Castro Netto A, Guerreiro BM, Silveira CRA, Moreira RJC, et al. Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve *in vitro* embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. *Theriogenology*. 2014;82(2): 318–324. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.04.013>.
131. Bó GA, Mapletoft RJ. Superstimulation of ovarian follicles in cattle: Gonadotropin treatment protocols and FSH profiles. *Theriogenology*. 2020;150: 353–359. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.02.001>.
132. Gifre L, Arís A, Bach À, Garcia-Fruitós E. Trends in recombinant protein use in animal production. *Microbial Cell Factories* 2017 16:1. 2017;16(1): 1–17. <https://doi.org/10.1186/S12934-017-0654-4>.
133. Khan SU, Jamal MA, Su Y, Wei HJ, Qing Y, Cheng W. Towards Improving the Outcomes of Multiple Ovulation and Embryo Transfer in Sheep, with Particular Focus on Donor Superovulation. *Veterinary Sciences*. 2022;9(3): 117. <https://doi.org/10.3390/vetsci9030117>.
134. Wilson ME, Morris JC, Gibbons JR. Bioactive, bacterial-derived recombinant bovine follicle stimulating hormone. In: *Reproduction, Fertility and Development*. 2009. p. 246. <https://doi.org/10.1071/RDv21n1Ab299>. [Accessed 29th January 2024].
135. Hélène B, Céline L, Patrick C, Fabien R, Christine V, Yves C, et al. High-level secretory production of recombinant porcine follicle-stimulating hormone by *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry*. 2001;36(8–9): 907–913. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00296-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00296-X).

136. Kamei H, Ohira T, Yoshiura Y, Uchida N, Nagasawa H, Aida K. Expression of a biologically active recombinant follicle stimulating hormone of Japanese Eel *Anguilla japonica* using methylotropic yeast, *Pichia pastoris*. *General and Comparative Endocrinology*. 2003;134(3): 244–254. [https://doi.org/10.1016/S0016-6480\(03\)00259-4](https://doi.org/10.1016/S0016-6480(03)00259-4).
137. Kuttayil SS, Pathak BR, Dighe RR, Mahale SD. Expression of Bioactive *Callithrix jacchus* Follicle-Stimulating Hormone in *Pichia pastoris*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2015;176(2): 399–411. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1583-5>.
138. Luo G, Tian JH, Huang H, Lei An. Improving heterologous expression of porcine follicle-stimulating hormone in *Pichia pastoris* by integrating molecular strategies and culture condition optimization. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018;102(20): 8867–8882. <https://doi.org/10.1007/S00253-018-9260-6>.
139. Yu X, Lin SW, Kobayashi M, Ge W. Expression of recombinant zebrafish follicle-stimulating hormone (FSH) in methylotropic yeast *Pichia pastoris*. *Fish Physiology and Biochemistry*. 2010;36(2): 273–281. <https://doi.org/10.1007/s10695-008-9244-z>.
140. Dirnberger D, Steinkellner H, Abdennebi L, Remy JJ, Van De Wiel D. Secretion of biologically active glycoforms of bovine follicle stimulating hormone in plants. *European Journal of Biochemistry*. 2001;268(16): 4570–4579. <https://doi.org/10.1046/J.1432-1327.2001.02384.X>.
141. Kato Y, Sato I, Ihara T, Tomizawa K, Mori J, Geshi M, et al. Expression and purification of biologically active porcine follicle- stimulating hormone in insect cells bearing a baculovirus vector. *Journal of Molecular Endocrinology*. 1998;20(1): 55–65. <https://doi.org/10.1677/JME.0.0200055>.
142. Kazeto Y, Kohara M, Miura T, Miura C, Yamaguchi S, Trant JM, et al. Japanese Eel Follicle-Stimulating Hormone (Fsh) and Luteinizing Hormone (Lh): Production of Biologically Active Recombinant Fsh and Lh by *Drosophila* S2 Cells and Their Differential Actions on the Reproductive Biology. *Biology of Reproduction*. 2008;79(5): 938–946. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.108.070052>.
143. van de Wiel DFM, van Rijn PA, Meloen RH, Moormann RJM. High-level expression of biologically active recombinant bovine follicle stimulating hormone in a baculovirus system Bluetongue Pathogenesis: molecular determinant of virulence View project PhD thesis work on orbiviruses View project. *Journal of Molecular Endocrinology*. 1998;20: 83–98. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0200083>.
144. Fachal MV, Furlan M, Clark R, Card CE, Chedrese PJ. Synthesis and characterization of biologically active recombinant elk and horse FSH. *Animal Reproduction Science*. 2010;117(3–4): 331–340. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.05.007>.
145. Jennings MW, Boime I, Daphna-Iken D, Jablonka-Shariff A, Conley AJ, Colgin M, et al. The efficacy of recombinant equine follicle stimulating hormone (reFSH) to promote follicular growth in mares using a follicular suppression model. *Animal Reproduction Science*. 2009;116(3–4): 291–307. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.01.013>.
146. Wilson JM, Jones AL, Moore K, Looney CR, Bondioli KR. Superovulation of cattle with a recombinant-DNA bovine follicle stimulating hormone. *Animal Reproduction Science*. 1993;33(1–4): 71–82. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(93\)90107-3](https://doi.org/10.1016/0378-4320(93)90107-3).
147. Carvalho PD, Hackbart KS, Bender RW, Baez GM, Dresch AR, Guenther JN, et al. Use of a single injection of long-acting recombinant bovine FSH to superovulate

- Holstein heifers: A preliminary study. *Theriogenology*. 2014;82(3): 481–489. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2014.05.011>.
148. Rodrigues CA, Castro Netto A, Catussi BLC, Rebeis LM, Pinho P, Randi F, et al. 084 Superstimulation prior to the ovum pick-up with a single dose of recombinant FSH improves in vitro embryo production in Holstein heifers. *Animal - science proceedings*. 2023;14(3): 483–484. <https://doi.org/10.1016/j.anscip.2023.03.085>.
 149. Rodrigues CA, Castro Netto A, Catussi BLC, Rebeis LM, Pinho P, Randi F, et al. 086 Superstimulation prior to ovum pick-up with a single dose of recombinant FSH improves in vitro embryo production in lactating Holstein cows. *Animal - science proceedings*. 2023;14(3): 484–485. <https://doi.org/10.1016/j.anscip.2023.03.087>.
 150. Durocher Y, Butler M. Expression systems for therapeutic glycoprotein production. *Current Opinion in Biotechnology*. 2009;20(6): 700–707. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.10.008>.
 151. Mufarrege EF, Antuña S, Etcheverrigaray M, Kratje R, Prieto C. Development of lentiviral vectors for transient and stable protein overexpression in mammalian cells. A new strategy for recombinant human FVIII (rhFVIII) production. *Protein Expression and Purification*. 2013;95: 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.11.005>.
 152. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, et al. A Third-Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. *Journal of Virology*. 1998;72(11): 8463–8471. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.11.8463-8471.1998>.
 153. Miyoshi H, Blömer U, Takahashi M, Gage FH, Verma IM. Development of a Self-Inactivating Lentivirus Vector. *Journal of Virology*. 1998;72(10): 8150–8157. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.10.8150-8157.1998>.
 154. Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, et al. In Vivo Gene Delivery and Stable Transduction of Nondividing Cells by a Lentiviral Vector. *Science*. 1996;272(5259): 263–267. <https://doi.org/10.1126/science.272.5259.263>.
 155. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. 1979;7(6): 1513–1523. <https://doi.org/10.1093/nar/7.6.1513>.
 156. Smith DR. Gel Electrophoresis of DNA. In: Rapley R, Walker JM (eds) *Molecular Biomethods Handbook*. Totowa, NJ: Humana Press; 1998. p. 17–33. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-642-3_3. [Accessed 17th August 2025].
 157. Cook JA, Mitchell JB. Viability measurements in mammalian cell systems. *Analytical Biochemistry*. 1989;179(1): 1–7. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90191-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90191-7).
 158. Renard JM, Spagnoli R, Mazier C, Salles MF, Mandine E. Evidence that monoclonal antibody production kinetics is related to the integral of the viable cells curve in batch systems. *Biotechnology Letters*. 1988;10(2): 91–96. <https://doi.org/10.1007/BF01024632>.
 159. Prieto C, Fontana D, Etcheverrigaray M, Kratje R. A strategy to obtain recombinant cell lines with high expression levels. Lentiviral vector-mediated transgenesis. *BMC Proceedings*. 2011;5(Suppl 8): P7. <https://doi.org/10.1186/1753-6561-5-S8-P7>.
 160. Freshney R. Cloning and selection. In: *Culture of animal cells. A manual of basic technique*. New Jersey, USA: Wiley-Liss Inc; 2000. p. 195–213.

161. Mather JP. Optimizing cell and culture environment for production of recombinant proteins. *Methods in Enzymology*. 1990;185: 567–577. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)85045-P](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)85045-P).
162. ICH. *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Guidance for Industry Q2(R1)*. 2005.
163. ICH. *Guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis*. 2022.
164. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259): 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
165. Hames BD. One-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis. In: Hames BD, Rickwood D (eds) *Gel electrophoresis of proteins. A practical approach*. New York, USA: Oxford University Press, Inc.; 1990. p. 1–147.
166. Duan JZ. Pharmacokinetics of Oral Absorption. In: *Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics*. Seventh edition. New York: McGraw-Hill Education; 2016. p. 177–204.
167. Shargel L, Yu ABC, [eds]. *Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics..* Seventh edition. New York: McGraw-Hill Education; 2016.
168. Savic RM, Jonker DM, Kerbusch T, Karlsson MO. Implementation of a transit compartment model for describing drug absorption in pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2007;34(5): 711–726. <https://doi.org/10.1007/s10928-007-9066-0>.
169. Steelman SL, Polhey FM. Assay of the follicle stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotropin. *Endocrinology*. 1953;53(6): 604–616. <https://doi.org/10.1210/endo-53-6-604>.
170. Hunter JD. Matplotlib: A 2D Graphics Environment. *Computing in Science & Engineering*. 2007;9(3): 90–95. <https://doi.org/10.1109/MCSE.2007.55>.
171. Harris CR, Millman KJ, Van Der Walt SJ, Gommers R, Virtanen P, Cournapeau D, et al. Array programming with NumPy. *Nature*. 2020;585(7825): 357–362. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2649-2>.
172. McKinney W. Data Structures for Statistical Computing in Python. In: Austin, Texas; 2010. p. 56–61. <https://doi.org/10.25080/Majora-92bf1922-00a>. [Accessed 12th January 2024].
173. Vallat R. Pingouin: statistics in Python. *Journal of Open Source Software*. 2018;3(31): 1026. <https://doi.org/10.21105/joss.01026>.
174. Plotly Technologies Inc. *Collaborative data science*. Montreal, QC: Plotly Technologies Inc.; 2015. <https://plot.ly>
175. Virtanen P, Gommers R, Oliphant TE, Haberland M, Reddy T, Cournapeau D, et al. SciPy 1.0: fundamental algorithms for scientific computing in Python. *Nature Methods*. 2020;17(3): 261–272. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0686-2>.
176. Seabold S, Perktold J. Statsmodels: Econometric and Statistical Modeling with Python. In: Austin, Texas; 2010. p. 92–96. <https://doi.org/10.25080/Majora-92bf1922-011>. [Accessed 12th January 2024].
177. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM). *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry*. 2018. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance->

- documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry [Accessed 15th December 2024].
178. Aguilar MI. HPLC of Peptides and Proteins. In: Aguilar MI (ed.) *HPLC of Peptides and Proteins: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Springer New York; 2004. p. 3–8. <https://doi.org/10.1385/1-59259-742-4:3>. [Accessed 21st February 2025].
 179. Bradshaw T. Peptides and Proteins: General Aspects. In: *Introduction to peptide and protein HPLC*. Phenomenex; p. 11–14.
 180. Aguilar MI. Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. In: Aguilar MI (ed.) *HPLC of Peptides and Proteins: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Springer New York; 2004. p. 9–22. <https://doi.org/10.1385/1-59259-742-4:9>. [Accessed 21st February 2025].
 181. Bradshaw T. HPLC Techniques for the Analysis of Peptides and Proteins: Reversed Phase Chromatography. In: *Introduction to peptide and protein HPLC*. Phenomenex; 28-37.
 182. Rodríguez MC, Mussio PE, Villaraza J, Tardivo MB, Antuña S, Fontana D, et al. Physicochemical Characterization of a Recombinant eCG and Comparative Studies with PMSG Commercial Preparations. *The Protein Journal*. 2023;42(1): 24–36. <https://doi.org/10.1007/s10930-023-10092-x>.
 183. Alvarez RH, Natal FLN, Ribela MTCP, De Almeida BE, De Oliveira JE, Bartolini P. Physical-chemical and biological characterization of different preparations of equine chorionic gonadotropin. *Journal of Veterinary Science*. 2016;17(4): 459–465. <https://doi.org/10.4142/JVS.2016.17.4.459>.
 184. Ribela MTC, Loureiro RF, Oliveira JE, Carvalho CM, Peroni CN, Bartolini P. Analysis and characterization of different preparations of recombinant human follicle stimulating hormone (hFSH) and of its subunits. *Microbial Cell Factories*. 2006;5(1): P91. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-S1-P91>.
 185. Loureiro RF, de Oliveira JE, Torjesen PA, Bartolini P, Ribela MTCP. Analysis of intact human follicle-stimulating hormone preparations by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2006;1136(1): 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.09.037>.
 186. Almeida BE, Oliveira JE, Carvalho CM, Dalmora SL, Bartolini P, Ribela MTCP. Analysis of human luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin preparations of different origins by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2010;53(1): 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.03.013>.
 187. Loureiro RF. *Caracterização físico-química da foliculotrofina humana (hFSH) recombinante e de suas subunidades, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em fase reversa: comparação com a preparação de referência de hFSH de origem hipofisária do 'National Hormone and Pituitary Program' dos EUA*. [MSc] [São Paulo]: Universidade de São Paulo; 2006.
 188. Bradshaw T. HPLC Techniques for the Analysis of Peptides and Proteins: Size-Exclusion Chromatography (SEC). In: *Introduction to peptide and protein HPLC*. Phenomenex; p. 15–20.
 189. Goyon A, Beck A, Veuthey JL, Guilleme D, Fekete S. Comprehensive study on the effects of sodium and potassium additives in size exclusion chromatographic separations of protein biopharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2017;144: 242–251. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.09.031>.

190. D'Atri V, Imiolek M, Quinn C, Finny A, Lauber M, Fekete S, et al. Size exclusion chromatography of biopharmaceutical products: From current practices for proteins to emerging trends for viral vectors, nucleic acids and lipid nanoparticles. *Journal of Chromatography A*. 2024;1722: 464862. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2024.464862>.
191. Arakawa T, Ejima D, Li T, Philo JS. The critical role of mobile phase composition in size exclusion chromatography of protein pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010;99(4): 1674–1692. <https://doi.org/10.1002/jps.21974>.
192. Hong P, Koza S, Bouvier ESP. Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Biotherapeutics and their Aggregates. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2012;35(20): 2923–2950. <https://doi.org/10.1080/10826076.2012.743724>.
193. Ejima D, Yumioka R, Arakawa T, Tsumoto K. Arginine as an effective additive in gel permeation chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2005;1094(1): 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.07.086>.
194. Arakawa T, Ejima D, Tsumoto K, Obeyama N, Tanaka Y, Kita Y, et al. Suppression of protein interactions by arginine: a proposed mechanism of the arginine effects. *Biophysical Chemistry*. 2007;127(1–2): 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2006.12.007>.
195. Chotteau V, Schwarz H, Mäkinen M. Continuous Bioprocessing for Upstream Process: Perfusion Process. In: Pörtner R (ed.) *Biopharmaceutical Manufacturing: Progress, Trends and Challenges*. Cham: Springer International Publishing; 2023. p. 113–158. https://doi.org/10.1007/978-3-031-45669-5_4. [Accessed 20th April 2025].
196. Lao MS, Toth D. Effects of Ammonium and Lactate on Growth and Metabolism of a Recombinant Chinese Hamster Ovary Cell Culture. *Biotechnology Progress*. 1997;13(5): 688–691. <https://doi.org/10.1021/bp9602360>.
197. Fu T, Zhang C, Jing Y, Jiang C, Li Z, Wang S, et al. Regulation of cell growth and apoptosis through lactate dehydrogenase C over-expression in Chinese hamster ovary cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016;100(11): 5007–5016. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7348-4>.
198. Łojewska E, Kowalczyk T, Olejniczak S, Sakowicz T. Extraction and purification methods in downstream processing of plant-based recombinant proteins. *Protein Expression and Purification*. 2016;120: 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.12.018>.
199. Owczarek B, Gerszberg A, Hnatuszko-Konka K. A Brief Reminder of Systems of Production and Chromatography-Based Recovery of Recombinant Protein Biopharmaceuticals. *BioMed Research International*. 2019;2019: 4216060. <https://doi.org/10.1155/2019/4216060>.
200. Gervais A, Hammel YA, Pelloux S, Lepage P, Baer G, Carte N, et al. Glycosylation of human recombinant gonadotrophins: Characterization and batch-to-batch consistency. *Glycobiology*. 2003;13(3): 179–189. <https://doi.org/10.1093/GLYCOB/CWG020>.
201. Taipa MÂ, Fernandes P, de Carvalho CCCR. Production and Purification of Therapeutic Enzymes. In: Labrou N (ed.) *Therapeutic Enzymes: Function and Clinical Implications*. Singapore: Springer; 2019. p. 1–24. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7709-9_1. [Accessed 3rd February 2025].

202. de Olivera Santos MV, de Quiroz Neta LB, Azevedo Borges A, Fernandes Pereira A. Influence of commercially available follicle stimulating hormone on the in vitro maturation of bovine oocytes. *Semina: Ciências Agrárias*. 2017;38(3): 1393–1401. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n3p1393>.
203. Labrou NE. Protein Purification Technologies. In: Labrou NE (ed.) *Protein Downstream Processing: Design, Development, and Application of High and Low-Resolution Methods*. New York, NY: Springer US; 2021. p. 3–10. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0775-6_1. [Accessed 3rd February 2025].
204. Sinegubova M, Vorobiev I, Klishin A, Eremin D, Orlova N, Orlova N, et al. Purification Process of a Recombinant Human Follicle Stimulating Hormone Biosimilar (Primapur(R)) to Yield a Pharmaceutical Product with High Batch-to-Batch Consistency. *Pharmaceutics*. 2022;14(1): 106. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS14010096>.
205. Loumaye E, Dreano M, Galazka A, Howles C, Ham L, Munafo A, et al. Recombinant follicle stimulating hormone: development of the first biotechnology product for the treatment of infertility. *Human Reproduction Update*. 1998;4(6): 862–881. <https://doi.org/10.1093/humupd/4.6.862>.
206. Rigüero V, Clifford R, Dawley M, Dickson M, Gastfriend B, Thompson C, et al. Immobilized metal affinity chromatography optimization for poly-histidine tagged proteins. *Journal of Chromatography A*. 2020;1629: 461505. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2020.461505>.
207. Bornhorst JA, Falke JJ. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods in Enzymology*. 2000;326: 245–254. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(00\)26058-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(00)26058-8).
208. Porath J. Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expression and Purification*. 1992;3(4): 263–281. [https://doi.org/10.1016/1046-5928\(92\)90001-D](https://doi.org/10.1016/1046-5928(92)90001-D).
209. Staub A, Guilleme D, Schappler J, Veuthey JL, Rudaz S. Intact protein analysis in the biopharmaceutical field. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2011;55(4): 810–822. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.01.031>.
210. Houel S, Hilliard M, Yu YQ, McLoughlin N, Martin SM, Rudd PM, et al. N- and O-Glycosylation Analysis of Etanercept Using Liquid Chromatography and Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry Equipped with Electron-Transfer Dissociation Functionality. *Analytical Chemistry*. 2014;86(1): 576–584. <https://doi.org/10.1021/ac402726h>.
211. Brooks SA. Strategies for Analysis of the Glycosylation of Proteins: Current Status and Future Perspectives. *Molecular Biotechnology*. 2009;43(1): 76–88. <https://doi.org/10.1007/s12033-009-9184-6>.
212. Mariño K, Bones J, Kattla JJ, Rudd PM. A systematic approach to protein glycosylation analysis: a path through the maze. *Nature Chemical Biology*. 2010;6(10): 713–723. <https://doi.org/10.1038/nchembio.437>.
213. Galway AB, LaPolt PS, Boime I, Hsueh AJW. Recombinant FSH and Regulation of Ovulation. In: Hunzicker-Dunn M, Schwartz NB (eds) *Follicle Stimulating Hormone: Regulation of Secretion and Molecular Mechanisms of Action*. New York, NY: Springer; 1992. p. 206–214. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-7103-8_17. [Accessed 17th February 2025].
214. Wide L, Wide M. Higher plasma disappearance rate in the mouse for pituitary follicle-stimulating hormone of young women compared to that of men and elderly women. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1984;58(3): 426–429. <https://doi.org/10.1210/jcem-58-3-426>.

215. Ulloa-Aguirre A, Miller C, Hyland L, Chappel S. Production of all follicle-stimulating hormone isohormones from a purified preparation by neuraminidase digestion. *Biology of Reproduction*. 1984;30(2): 382–387. <https://doi.org/10.1095/biolreprod30.2.382>.
216. Lee DSH. One-Compartment Open Model: Intravenous Bolus Administration. In: Shargel L, Yu ABC (eds) *Applied biopharmaceutics & pharmacokinetics*. Seventh edition. New York: McGraw-Hill Education; 2016. p. 75–96.
217. McGee EA, Perlas E, LaPolt PS, Tsafiri A, Hsueh AJ. Follicle-stimulating hormone enhances the development of preantral follicles in juvenile rats. *Biology of Reproduction*. 1997;57(5): 990–998. <https://doi.org/10.1095/biolreprod57.5.990>.
218. Hunzicker-Dunn M, Maizels ET. FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression: branching out from protein kinase A. *Cellular Signalling*. 2006;18(9): 1351–1359. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2006.02.011>.
219. Bergandi L, Canosa S, Carosso AR, Paschero C, Gennarelli G, Silvagno F, et al. Human Recombinant FSH and Its Biosimilars: Clinical Efficacy, Safety, and Cost-Effectiveness in Controlled Ovarian Stimulation for In Vitro Fertilization. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*. 2020;13(7): 136. <https://doi.org/10.3390/ph13070136>.
220. Lunenfeld B, Bilger W, Longobardi S, Alam V, D'Hooghe T, Sunkara SK. The Development of Gonadotropins for Clinical Use in the Treatment of Infertility. *Frontiers in endocrinology*. 2019;10(JUL): 429. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00429>.
221. Barrios-De-Tomasi J, Timossi C, Merchant H, Quintanar A, Avalos JM, Andersen CY, et al. Assessment of the in vitro and in vivo biological activities of the human follicle-stimulating isohormones. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2002;186(2): 189–198. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(01\)00657-8](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(01)00657-8).
222. Nevelli F, Palmese A, Gleixner R, Peroglio F, D'Acunto CW, Dadone A, et al. Biological Assay to Determine Gonadotropin Potency: From In Vivo to In Vitro Sustainable Method. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(9): 8040. <https://doi.org/10.3390/ijms24098040>.
223. Hauser H. Heterologous expression of genes in mammalian cells. In: *Mammalian Cell Biotechnology in Protein Production*. Berlin/Boston: De Gruyter, Inc; 1997. p. 3–27.
224. Hartley F, Walker T, Chung V, Morten K. Mechanisms driving the lactate switch in Chinese hamster ovary cells. *Biotechnology and Bioengineering*. 2018;115(8): 1890–1903. <https://doi.org/10.1002/bit.26603>.
225. Martínez VS, Dietmair S, Quek LE, Hodson MP, Gray P, Nielsen LK. Flux balance analysis of CHO cells before and after a metabolic switch from lactate production to consumption. *Biotechnology and Bioengineering*. 2013;110(2): 660–666. <https://doi.org/10.1002/bit.24728>.
226. Do T, Ho F, Heidecker B, Witte K, Chang L, Lerner L. A rapid method for determining dynamic binding capacity of resins for the purification of proteins. *Protein Expression and Purification*. 2008;60(2): 147–150. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2008.04.009>.
227. Guo J, Tu H, Atouf F. Measurement of Macro- And Micro-Heterogeneity of Glycosylation in Biopharmaceuticals: a Pharmacopeia Perspective. *Future Drug Discovery*. 2020;2(4): FDD48. <https://doi.org/10.4155/fdd-2020-0021>.

228. Kálmán-Szekeres Z, Olajos M, Ganzler K. Analytical aspects of biosimilarity issues of protein drugs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2012;69: 185–195. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.04.037>.
229. Steen H, Mann M. The abc's (and xyz's) of peptide sequencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2004;5(9): 699–711. <https://doi.org/10.1038/nrm1468>.
230. Edman P. Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chemica Scandinava* 4. 1950; 283–293.
231. Planinc A, Bones J, Dejaegher B, Van Antwerpen P, Delporte C. Glycan characterization of biopharmaceuticals: Updates and perspectives. *Analytica Chimica Acta*. 2016;921: 13–27. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.03.049>.
232. Tanaka M, Koga A, Kobe A, Sekimori Y, Aso Y, Terada K. O-linked glucosylation of a therapeutic recombinant humanised monoclonal antibody produced in CHO cells. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.* 2013;83(2): 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.11.001>.
233. Townsend RR, Hardy MR. Analysis of glycoprotein oligosaccharides using high-ph anion exchange chromatography. *Glycobiology*. 1991;1(2): 139–147. <https://doi.org/10.1093/glycob/1.2.139>.
234. Corradini C, Cavazza A, Bignardi C. High-Performance Anion-Exchange Chromatography Coupled with Pulsed Electrochemical Detection as a Powerful Tool to Evaluate Carbohydrates of Food Interest: Principles and Applications. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*. 2012;2012(1): 487564. <https://doi.org/10.1155/2012/487564>.
235. Andersen R, Sørensen A. Separation and determination of alditols and sugars by high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Journal of Chromatography A*. 2000;897(1): 195–204. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00783-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00783-4).
236. Rohrer JS, Thayer J, Weitzhandler M, Avdalovic N. Analysis of the N-acetylneuraminic acid and N-glycolylneuraminic acid contents of glycoproteins by high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Glycobiology*. 1998;8(1): 35–43. <https://doi.org/10.1093/glycob/8.1.35>.
237. Borromeo V, Amsterdam A, Berrini A, Gaggioli D, Dantes A, Secchi C. Characterization of biologically active bovine pituitary FSH purified by immunoaffinity chromatography using a monoclonal antibody. *General and Comparative Endocrinology*. 2004;139(2): 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2004.09.005>.
238. Grimek HJ, Gorski J, Wentworth BC. Purification and Characterization of Bovine Follicle-Stimulating Hormone: Comparison with Ovine Follicle-Stimulating Hormone*. *Endocrinology*. 1979;104(1): 140–147. <https://doi.org/10.1210/endo-104-1-140>.
239. Manjunath P, Sairam MR, Sairam J. Studies on pituitary follitropin X. Biochemical, receptor binding and immunological properties of deglycosylated ovine hormone. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 1982;28(2): 125–138. [https://doi.org/10.1016/0303-7207\(82\)90026-0](https://doi.org/10.1016/0303-7207(82)90026-0).
240. Whitley RJ, Keutmann HT, Ryan RJ. Studies on the Isolation and Chemical-Physical Properties of Porcine Follicle-Stimulating Hormone*. *Endocrinology*. 1978;102(6): 1874–1886. <https://doi.org/10.1210/endo-102-6-1874>.
241. dos Santos Rodrigues FH, Delgado GG, Santana da Costa T, Tasic L. Applications of fluorescence spectroscopy in protein conformational changes and

- intermolecular contacts. *BBA Advances*. 2023;3: 100091. <https://doi.org/10.1016/j.bbadva.2023.100091>.
242. Lakowicz JR, [ed.]. Protein Fluorescence. In: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Boston, MA: Springer US; 2006. p. 529–575. https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4_16. [Accessed 31st March 2025].
 243. Lakowicz JR, [ed.]. Instrumentation for Fluorescence Spectroscopy. In: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Boston, MA: Springer US; 2006. p. 27–61. https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4_2. [Accessed 29th March 2025].
 244. Meech SR. Excited state reactions in fluorescent proteins. *Chemical Society Reviews*. 2009;38(10): 2922–2934. <https://doi.org/10.1039/B820168B>.
 245. Eftink MR. Intrinsic Fluorescence of Proteins. In: Lakowicz JR (ed.) *Topics in Fluorescence Spectroscopy: Volume 6: Protein Fluorescence*. Boston, MA: Springer US; 2000. p. 1–15. https://doi.org/10.1007/0-306-47102-7_1. [Accessed 31st March 2025].
 246. Groen BH, Bloemendal M, Mulders JWM, Hadden JM, Chapman D, Van Stokkum IHM, et al. Spectroscopic characterization of recombinant follicle stimulating hormone. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 1996;52(10): 1331–1346. [https://doi.org/10.1016/0584-8539\(96\)01690-X](https://doi.org/10.1016/0584-8539(96)01690-X).
 247. Volkin DB, Sanyal G, Burke CJ, Middaugh CR. Preformulation Studies as an Essential Guide to Formulation Development and Manufacture of Protein Pharmaceuticals. In: Nail SL, Akers MJ (eds) *Development and Manufacture of Protein Pharmaceuticals*. New York, NY: Springer US; 2002. p. 1–46. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0549-5_1. [Accessed 2nd April 2025].
 248. Gournbatsi E, Povey JF, Smales CM. The effect of formulation variables on protein stability and integrity of a model IgG4 monoclonal antibody and translation to formulation of a model ScFv. *Biotechnology Letters*. 2018;40(1): 33–46. <https://doi.org/10.1007/s10529-017-2443-x>.
 249. Greenfield NJ. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols*. 2006;1(6): 2876–2890. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.202>.
 250. Kelly SM, Price NC. The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. <http://www.eurekaselect.com>. <https://www.eurekaselect.com/article/26718>
 251. Poole RA, Hawe A, Jiskoot W, Braeckmans K. Fluorescence Spectroscopy to Characterize Protein Aggregates and Particles. In: *Analysis of Aggregates and Particles in Protein Pharmaceuticals*. John Wiley & Sons, Ltd; 2012. p. 201–226. <https://doi.org/10.1002/9781118150573.ch9>. [Accessed 11th February 2025].
 252. Vega Castro NA, Reyes Montaña EA. *Introducción al análisis estructural de proteínas y glicoproteínas*. Colombia: Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias; 2020.
 253. Mapletoft RJ, Gonzalez A, Lussier JG, Murphy BD, Carruthers TD. Superovulation of beef heifers with folltropin or FSH-P. *Theriogenology*. 1988;29(1): 274. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(88\)90102-1](https://doi.org/10.1016/0093-691x(88)90102-1).
 254. Wilson JM, Moore K, Jones AL, Looney CR. Recombinant bovine follicle-stimulating hormone: Dose and duration regimens for superovulation of embryo donors. *Theriogenology*. 1989;31(1): 273. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(89\)90681-X](https://doi.org/10.1016/0093-691X(89)90681-X).

255. Sanderson N, Martinez M. A single administration of a long-acting recombinant ovine FSH (roFSH) for cattle superovulation. *Theriogenology*. 2020;154: 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.037>.
256. Kanitz W, Becker F, Schneider F, Kanitz E, Leiding C, Nohner HP, et al. Superovulation in cattle: practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. *Reproduction Nutrition Development*. 2002;42(6): 587–599. <https://doi.org/10.1051/RND:2002045>.
257. Adams T, Boime I. The Expanding Role of Recombinant Gonadotropins in Assisted Reproduction. *Reproduction in Domestic Animals*. 2008;43(s2): 186–192. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01160.x>.