

3.2 Modificación genética de células de mamífero para producción de anticuerpos recombinantes e inmunocomplejos para tratamiento de cáncer cervicouterino.

Herrera Juan^{1,2}, Robles Eduardo¹, Badillo Agustín¹, Castrejón José¹, Durán Née^{1,3}. 1. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI) del Instituto Politécnico Nacional (IPN). 2. Juanherrera55@gmail.com.

Resumen: El cáncer de cuello uterino es una enfermedad en la que se observa un proceso descontrolado en la división de las células epiteliales cervicales, este es causado por una infección de las células epiteliales cervicales por ciertos tipos del virus del papiloma humano (VPH). Según "The American Cancer Society" es uno de los tipos de cáncer más comunes a nivel mundial con aproximadamente 529409 mujeres infectadas anualmente y con una tasa de mortalidad de un 50%. Las vacunas que se encuentran en el mercado contra este virus han presentado una gran cantidad de efectos adversos en las personas en quien son aplicadas, como dolores fuertes, desmayos, tromboembolismo y/o el síndrome de Guillain-Barré. Es por lo cual se ve en la necesidad de la generación de nuevas vacunas nuevas formas de tratamiento que no presentes efectos adversos o que sean sustancialmente menores. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es producir anticuerpos recombinantes e inmunocomplejos en líneas celulares de mamífero CHO para su posible aplicación como vacuna y/o tratamiento de cáncer cervicouterino. Con este fin, se construyeron dos vectores el pJSH1 y pDLCH3 los cuales contiene los genes que codifican para la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo recombinante AntiL1 respectivamente. Con dichos vectores se transformaron las células CHO mediante las técnicas de polifección y lipofección, siendo esta ultima la que afecto menos la viabilidad de las células transformadas. Finalmente se produjo un anticuerpo recombinante antiL1 utilizando células CHO transformadas con vectores pJSH1 y pDLCH3. El mejoramiento y escalamiento de la producción del anticuerpo recombinante permitirá realizar ensayos de inmunización *in vivo* para la validación del tratamiento.

Abstract: The cervical cancer is a disease in which an uncontrolled process is observed in the division of cervical epithelial cells, it is caused by an infection of the cervical epithelial cells by certain types of human papillomavirus (HPV). According to "The American Cancer Society" It is one of the most common cancer worldwide with approximately 52,9409 women infected annually and with a mortality rate of 50%. The vaccines on the market against this virus have presented a great number of adverse effects in the people in whom they are applied, such as pain, fainting, thromboembolism and Guillain-Barré syndrome. This is why it is necessary to generate new vaccines that do not present adverse effects.

The aim of this work was to produce recombinant antibodies and immunocomplexed in CHO mammalian cell lines for use as a vaccine in the treatment of cervical cancer. To this end, two vectors were constructed pJSH1 and pDLCH3 which contain the genes coding for the heavy chain and the light chain of a recombinant AntiL1 antibody, respectively. With these vectors the CHO cells were transformed by the techniques of polyfection and lipofection, the latter being the one that affected the viability of the transformed cells. Finally, an antiL1 recombinant antibody was produced using CHO cells transformed with vectors pJSH1 and pDLCH3.

Palabras claves: Inmunización Pasiva, Infecciones por Papillomavirus.

Introducción: El cáncer de cuello uterino es la principal causa de la mortalidad por tumores

malignos entre las mujeres de 20 a 40 años de edad en América Latina, y la tercera causa más común de muerte por cáncer en las mujeres a nivel mundial, sólo superada por el cáncer de mama y el de pulmón [1]. Según "The American Cancer Society" (ACS) en el 2014 se estimó que a nivel mundial son 529,409 mujeres las que son infectadas anualmente y se presenta una tasa de mortalidad de un 50% en los países en vía de desarrollo [2].

Actualmente hay 2 marcas de la vacuna contra el VPH en el mercado, Gardasil y Cervarix, con 3 productos disponibles que confieren protección contra 2, 4 ó 9 serotipos [3]. Ambas marcas tienen como blanco principal a los 2 tipos de VPH (16 y 18) que causan más del 60% de todos los cánceres asociados a este virus en América, de igual manera han demostrado que pueden prevenir lesiones precancerosas del cuello uterino en las mujeres [4].

A pesar que se ha demostrado que todas las células presentes en el cáncer de cuello uterino expresan antígenos específicos del VPH y de oncogenes virales de alto riesgo, la capacidad de las vacunas para prevenir este tipo de cáncer es muy deficiente, y han presentado una gran cantidad de efectos adversos en las personas en quien son aplicadas, como dolores fuertes, desmayos, tromboembolismo y/o el síndrome de Guillain-Barré [5].

Una nueva estrategia terapéutica ha surgido últimamente: el uso de anticuerpos recombinantes; ya que estos tienen la capacidad de neutralizar a casi cualquier agente patógeno (virus, bacterias), de igual manera pueden controlar (detener) el crecimiento de cualquier célula anormal del cuerpo [6]. Estos anticuerpos se unen a la superficie de los antígenos (por ejemplo, proteínas en la membrana de una bacteria), e inician la activación del sistema "clásico" del complemento. Esto acaba con la muerte del patógeno de dos formas: la primera, la unión de las moléculas del complemento con el anticuerpo marca al microorganismo para la ingestión por los fagocitos en un proceso llamado opsonización; o como opción, algunos componentes del sistema del complemento forman un complejo de ataque a membrana para ayudar a los anticuerpos a matar a la bacteria por medio de lisis [7].

Materiales y Métodos:

A. Medios de cultivo utilizados

El medio utilizado para el crecimiento de las células CHO es el "Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose" o DMEM suplementado con 0,1% de antibiótico, 4% de bicarbonato y con diferentes concentraciones de suero fetal bovino (10% de suero para su conservación y crecimiento, y 0% para su transformación y selección).

B. Líneas celulares

Las líneas celulares CHO utilizadas en este proyecto fueron donadas por la Dra. Zazil Herrera del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, conservadas en medio DMEM con 10% de suero fetal bovino (DFB) y mantenidas en nitrógeno líquido hasta su uso.

Preparación de las líneas celulares

C. Transformación de las líneas celulares

Para transformar las células CHO se utilizaron dos técnicas, la primera de ellas es la polifeción, para la cual se empleó polietilenamina 25 kDa (Polysciences) a una concentración de 1 mg/mL en H₂O miliQ, en placas de cultivo de 48 pozos con aproximadamente 5x10⁵ células. Se emplearon diferentes cantidades de polietilenamina (0.1-15 µg) y distintas cantidades de ADN (0.15-1.7 µg) de alta pureza (280/230 nm = 1.8 ± 0.02). Veinticuatro horas previas a la polifeción se sembraron las células en cada uno de los pozos y 30 minutos previo a la polifeción se mezclaron el ADN, la polietilenamina en 250 µL de medio DMEM/HAMFS-12 (Caisson Labs) sin ningún aditivo. La mezcla se agitó vigorosamente en vortex y se incubó a temperatura ambiente por 30 min. A cada pozo se le retiró todo el medio y se realizó un lavado con 200 µL de PBS, inmediatamente se adicionó la

mezcla ADN-poli-etilena-mina y las placas se incubaron a 37°C por 2 h. Posteriormente se reemplazó el medio de polifeción por 250 µL de medio de crecimiento fresco con los antibióticos de selección. Los análisis de viabilidad celular se realizaron cada 48h por dos semanas.

La segunda técnica utilizada fue la lipofeción, para lo cual se empleó el reactivo Transfectin lipid reagent (BioRad), según las indicaciones del proveedor, 24 horas previas a la transformación, de igual forma que en la anterior técnica, se sembraron 5x10⁵ células en cada uno de los pozos de la placa de 48 pozos, se emplearon diferentes cantidades del reactivo (0.2-5 µL) y distintas cantidades de ADN (0.15-0.7 µg) de alta pureza (280/230 nm = 1.8 ± 0.02), para cada pozo se mezcló ADN-agente de lipofeción en 750 µL de medio DMEM/HAMFS-12 (Caisson Labs), se incubó por 20 min a temperatura ambiente, se adicionó la mezcla a cada pozo, 4 h después se retiró el medio de cultivo y se reemplazó por medio nuevo con el antibiótico de selección. Los análisis de viabilidad celular y microscopía se realizaron cada 48 h. Para verificar la producción de las proteínas de interés, se retiró el suero obtenido de los cultivos cada 48 h y fue guardado a -20°C para su análisis.

D. Verificación de la producción del anticuerpo recombinante

Se prepararon geles de poli-acrilamida al 15% con: 1 mL de Tris-HCl 1.875 M a pH 8.8, 1.43 mL de agua destilada, 2.5 mL de la solución de acrilamida (38.93 g de Acrilamida Sigma-Aldrich y 1.07 g de Bis-Acrilamida Sigma Aldrich para un volumen final de 100 mL), 0,05 ml de SDS 10%, 0.025 mL de persulfato de amonio al 10% y 0.001 ml de TEMED.

Se calentaron las muestras a 95°C por 5 minutos, se cargaron 10 µL de las muestras. Se corrieron los geles por 15 minutos a 30 V y después a 120 V por 1 h. Para el western blot, se transfirieron las proteínas corridas en el SDS a una membrana de nitrocelulosa durante 1 h a 18 V. Pasado el tiempo se procedió al tratamiento para western-Blot con el anticuerpo específico (1 µL de Anti-HumanFc en 15 mL de PBST-Tween).

Resultados y Discusión:

Para poder obtener anticuerpos recombinantes utilizando células de mamífero CHO, es necesario la construcción de uno o dos vectores que codifiquen para la expresión de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo [8]. Ambas cadenas están conformadas por una región constante y una variable. En trabajos anteriores realizados por el grupo de investigación, se construyeron dos vectores que contenían la región variable y constante de la cadena pesada y la cadena ligera (pJSH1 para la cadena pesada; y el pDLCH3A para la cadena ligera). Cabe destacar que la región variable fue sintetizada y clonada en cada uno de los vectores, tomando como base la región de un anticuerpo monoclonal previamente reportado. Como primer paso se verificó que se encontraran correctamente plegadas las regiones variables y constantes de ambas cadenas en cada plásmido, para esto, se realizó una PCR convencional con los oligos denominados IC1 e IC5 (**Figura 1**).

Lista de figuras:

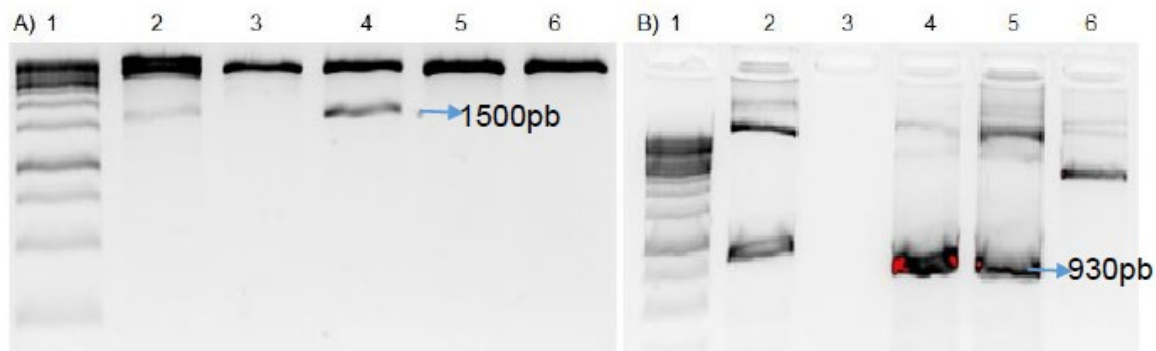


Figura 1. Confirmación de la inserción de los casetes en los vectores finales. A) PCR de las colonias transformadas con el vector obtenido de la reacción de restricción y ligación de la cadena pesada y el vector pGFP. Carril 1 marcador de peso, carril 2 control positivo, carril 3 control negativo, carriles 4, 5 y 6 colonias transformadas con el producto de la reacción. B) PCR de las colonias transformadas con el vector obtenido de la reacción de restricción y ligación de la cadena ligera y el vector pCpGFree. Carril 1 marcador de peso, carril 2 control positivo, carril 3 control negativo, carriles 4, 5 y 6 colonias transformadas con el producto de la reacción. Gel de agarosa al 1% 90V a 1 h.

Una vez contruidos los vectores, la siguiente parte fue la transformación de la línea celular CHO. Para lograr una transformación hay que considerar varios aspectos: la técnica a utilizar para la inserción del vector, la cantidad de vector necesario, el método de selección, entre otros. En este trabajo se evaluaron dos técnicas de transformación de células de mamífero con el fin de producir anticuerpos recombinantes antiL1: La polifección y la lipofección.

Para la lipofección se empleó el reactivo transfectin lipid reagent (BioRad), y para la polifección el reactivo PEI; con cultivos de alrededor 5×10^5 células en placas de 24 pozos con distintas cantidades de los reactivos (4-6 μL de Lipofectin y de 5 a 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PEI) y 1.5 μg de los vectores pJSH1 y pDLCH3. Los resultados de la lipofección se analizaron por microscopia óptica 48h posteriores a la transformación. A cada ensayo se le realizó tres replicas por triplicado y se evaluaron la eficiencia de transformación por porcentaje de viabilidad celular y presencia de fluorescencia en estas condiciones. Como controles de crecimiento se utilizó células sin transformar en presencia y ausencia de los antibióticos de selección blasticidina y G418.

No existe una gran diferencia entre los resultados de viabilidad celular obtenidos por el método de polifección y los obtenidos por lipofección (**Figura 2**), sin embargo, la morfología de las células transformadas por el segundo método no resultaba tan alteradas como las transformadas con los cuerpos catiónicos.

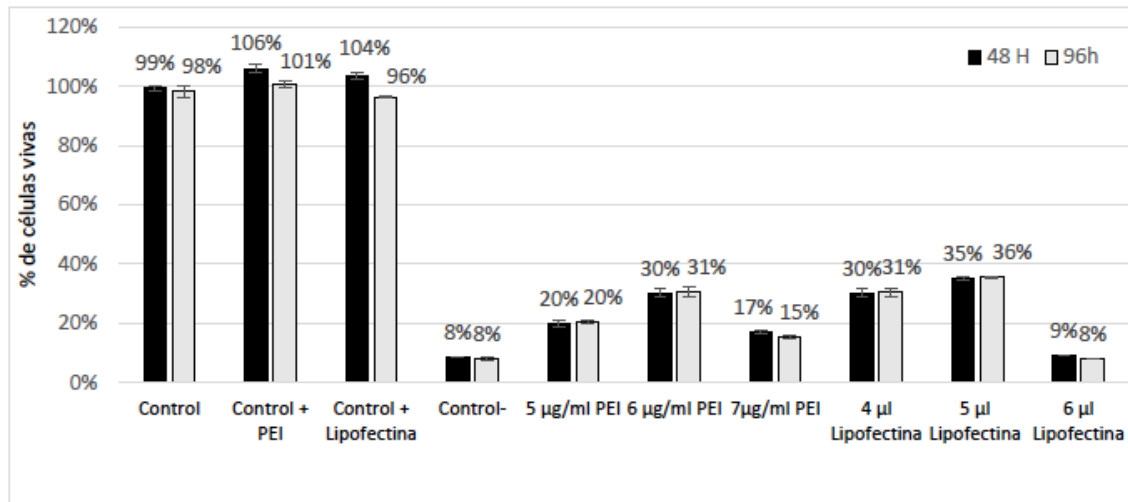


Figura 2. Determinación de la concentración óptima del reactivo transfectin lipid reagent y del PEI en la eficiencia de transformación de la línea celular CHO. La eficiencia de la transformación fue determinada mediante la viabilidad de las células en el medio en presencia del antibiótico de selección (blasticidina). Los datos graficados corresponden a la media de 3 réplicas con 3 repeticiones cada una.

Una vez obtenidos los vectores y los protocolos estandarizados para la transformación de células CHO, el siguiente paso fue la producción y detección del anticuerpo recombinante. Para dicho fin la siguiente parte fue realizar un western blot de los productos intray extracelulares tan utilizando un anticuerpo anti IgG humano. En el SDS los productos de lisis celular no se encontró una banda específica que nos indicara que las células transformadas estaban expresando el anticuerpo (**Figura 3A**), pero cuando se realizó el western blot se logró observar una banda de 150 kDa (**Figura 3B**) en el control positivo y en las lisis celulares de las células transformadas con los vectores pJSH1 y pDLCH3, lo cual permite suponer que estas células estaban expresando y ensamblando al anticuerpo recombinante antiL1.

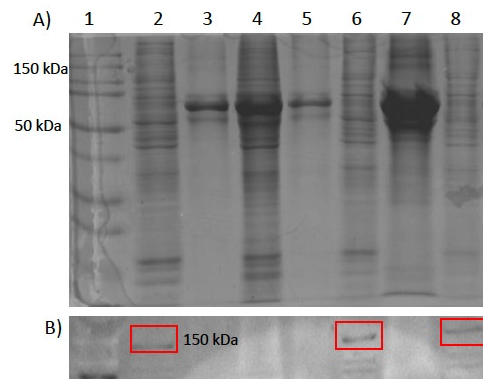


Figura 3. Detección del anticuerpo recombinante antiL1 de las células CHO transformadas con los vectores pJSH1 y pDLCH3 por SDS-PAGE y western blot. Carril 1 Marcador de peso; carril 2, como control positivo se utilizó el producto de la lisis de linfocitos B; carril 3, extracto extracelular de células sin transformar como control negativo; carril 4, producto de lisis de células sin transformar; carril 5, extracto extracelular de células transformadas por lipofección; carril 6 producto de lisis de células transformadas por lipofección; carril 7 extracto extracelular de células transformadas por polifección; carril 8- producto de la lisis de las células transformadas por polifección. A) SDS-PAGE, gel de Acrilamida al 10% 30 °V por 30 min y 120°V por 1 H. B) Western blot, Ab primario (Mouse anti Fc de un IgG humano.) 1/20000 1h 30 min. Ab Secundario

1/10000 1 h (anti Mouse HRP). C) Purificación del Ab recombinante por perlas magnéticas, carril 1 extracto total, carril 2 y 3 controles positivos, carriles 4, 5 y 6 muestras intracelulares, 7 control negativo.

Discussion:

Con el fin de poder obtener un anticuerpo recombinante en una línea celular de mamífero en este trabajo se diseñó y construyeron dos vectores que permitieran transformar y seleccionar las células que expresaran los genes AntiL1-Hc y AntiL1-Lc. En este trabajo se construyeron dos vectores el pJSH1 y pDLCH3 mediante la subclonación de los genes AntiL1-HC y AntiL1-LC en los esqueletos de los vectores pEGFP y pCpGfree respectivamente. Este último vector contiene el gen Bsr- Δ CpG el cual confiere resistencia a blastidina (la cual inhibe la formación del enlace peptídico en los ribosomas durante la traducción), así como el promotor central del factor de elongación humano 1 α (EF1), y elementos MAR (matrix attachment región) dichas secuencias aumentan la probabilidad de que el vector se integre efectivamente en el genoma de la célula blanco [9]. El vector PEGFP no cuenta con dichas regiones, pero cuenta también con un promotor fuerte para células de mamífero (pCMV) y con una proteína reportera que es la green fluorescent protein (GFP), lo cual nos permitió observar las células que habían integrado dicho vector.

A pesar de que en este trabajo se logró la transformación de las líneas celulares CHO por ambos vectores, se recomienda a futuro el uso de un vector más versátil. El cual posea ambos casetes (el de la cadena pesada y la cadena ligera), esto con el fin de facilitar el proceso de transformación y selección de las células CHO. Aunque Schlatter y colaboradores en el 2005 observaron que a nivel de producción de un anticuerpo recombinante no afecta si las células fueron transformadas con un o dos vectores [10]. Dentro de las ventajas que tienen estos vectores universales vale la pena mencionar que solo se necesita un marcador de selección y facilita los procesos de transformación, ya que solo es un vector el que se quiere ingresar.

El sistema pDual Expression Vectors resulta ser una alternativa prometedora para el diseño y construcción de vectores múltiples para la transformación de líneas celulares de mamífero. Dichos vectores cuentan con dos copias del promotor pCMV para la producción de las dos cadenas del anticuerpo recombinante, además de que posee la señal de poliadenilación SV40, estas secuencias se encuentran en la mayoría de plásmidos utilizados para la transformación de células animales. Investigaciones como las realizadas por Schlatter [10], Underhill [11] demostraron el éxito de este sistema para la producción de sus respectivos anticuerpos o proteínas de interés en diferentes líneas celulares de mamífero.

Además del diseño de los vectores, otro aspecto a considerar para mejorar los rendimientos de transformación de las líneas celulares es el método utilizado para transfectar a las células de mamífero. En este trabajo se obtuvieron eficiencias bajas de transformación, si se quisiera escalar el proceso para la obtención alta de anticuerpos recombinantes es necesario mejorar dicha eficiencia. Dentro de las técnicas de transformación de células animales la virofección es una de las más eficaces, este es el método más utilizado e ya que permite la obtención de células transfectadas con expresión estable ya que inserta los casetes de expresión deseados en el genoma de las células utilizadas.

Uno de los sistemas más utilizados para la transformación de líneas celulares de mamífero por virofección es el MLV (por sus siglas en inglés Murine Leukemia Virus), ya que este, es capaz de integrar el ADN dentro del genoma de la célula huésped y dicha información es heredada a las células hijas, generando así una línea celular estable que expresara la proteína de interés por un gran número de generaciones. Una de las ventajas que se tiene el generar una línea celular estable para la producción de un anticuerpo recombinante, es que una vez que se obtiene dicha línea se

puede empezar con los procesos de escalado del bioproceso, esto con el fin de hacerlo competitivo a la hora de compararlo con otros sistemas de expresión.

Bibliografía

- [1] L. N. Capote, «Epidemiology of cervical cancer in Latin America.,» *Ecancer Medical Science*, pp. 1-14, 2015.
- [2] V. Villegas, S. Juárez, O. Pérez y H. Arreola, «Heterogeneity of microRNAs expression in cervical cancer cells: over-expression of miR-196a.,» *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, vol. 7, nº 4, pp. 1389-1401., 2014.
- [3] B. Pahud y K. Ault, «The Expanded Impact of Human Papillomavirus Vaccine.,» *Infect Dis Clin N Am.*, p. 715–724, 2015.
- [4] M. Nygard, A. Saah y C. Munk, «Evaluation of the long-term anti-HPV 6, 11, 16, and 18 immune responses generated by gardasil.,» *Clin Vaccine Immunol.*, pp. 943-948., 2015.
- [5] J. Schiller, X. Castellsagué y S. Garland, «A review of clinical trials of human papillomavirus prophylactic vaccines.,» *Vaccine*, 30S., pp. 123-138., 2012.
- [6] K. Kisung, «Expression of Recombinant Vaccines and Antibodies in Plants.,» *MONOCLONAL ANTIBODIES IN IMMUNODIAGNOSIS AND IMMUNOTHERAPY.*, pp. 1-7, 2014.
- [7] J. Ravetch y S. Bolland, «IgG Fc receptors.,» *Annu Rev Immunol*, pp. 275-290., 2001.
- [8] S. Mayfield y S. Franklin, «Expression of human antibodies in eukaryotic micro-algae.,» *Vaccine*, p. 1828–1832, 2005.
- [9] A. Bandaranyake y S. Almo, «Recent advances in mammalian protein production.,» *FEBS Lett.*, pp. 253-260., 2014.
- [10] S. Schlatter, S. Stansfield, D. Dinnis, A. Racher, J. Birch y D. James, «On the Optimal Ratio of Heavy to Light Chain Genes for Efficient Recombinant Antibody Production by CHO Cells.,» *Biotechnol. Prog.*, pp. 122-133., 2005.
- [11] M. F. Underhill, C. M. Smales, L. H. Naylor, J. R. Birch y D. C. James, «Transient Gene Expression Levels from Multigene Expression Vectors.,» *Biotechnol. Prog.*, pp. 435-443., 2007.