



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UNA LÍNEA CELULAR CHO PRODUCTORA DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL RECOMBINANTE ANTI-ESFINGOMIELINASA-D DE LAS ARAÑAS *Loxosceles boneti* y *Loxosceles reclusa*

* Viguera-Meneses Liliana G.¹, Olvera, A.², Alagón, A.², ** Valdez-Cruz Norma A.¹

¹Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Ciudad Universitaria 3000, Coyoacán, C.P. 04510. México D.F. ²Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, UNAM. Avenida Universidad No 2001, Col. Chamilpa, CP 6221. Cuernavaca Morelos. e-mail: * vigueras.meneses@gmail.com, ** adrivaldez1@gmail.com

Palabras clave: Proteínas recombinantes, Anticuerpo monoclonal, Elementos reguladores

Introducción. Los avances en ingeniería genética han hecho posible la producción de proteínas recombinantes que en la actualidad se usan en la terapia de algunas enfermedades, diagnóstico clínico, entre otros (1). Al menos 30% de las proteínas recombinantes terapéuticas son glicosiladas, de ahí que se produzcan en sistemas celulares capaces de realizar modificaciones similares a las que se llevan a cabo en células humanas, tales como la N-glicosilación. Usualmente las glicoproteínas recombinantes, como los anticuerpos monoclonales (mAb), son expresadas en células de ovario de hamster chino (CHO) (2). Durante los últimos años, la generación de líneas celulares productoras de mAb recombinantes ha requerido del entendimiento de los elementos celulares que regulan la expresión y las limitaciones del sistema para expresar altas cantidades de la glicoproteína de forma estable o transitoria (3). El objetivo del presente trabajo es diseñar una línea celular que exprese un mAb recombinante que reconozca la esfingomielinasa-D (SMD) de las arañas *L. reclusa* y *L. boneti*, mediante el uso de reguladores transcripcionales y traduccionales para mejorar su procesamiento, estructuración y secreción en células CHO.

Metodología. Se realizó una búsqueda bibliográfica de reguladores transcripcionales y traduccionales para mejorar la expresión de los genes codificantes para cadena pesada y ligera de forma diferencial. Esto con la finalidad de estudiar la relación estequiométrica entre ambas cadenas que resulte en un aumento en la productividad de mAb anti-SMD. Los elementos elegidos fueron añadidos a las regiones codificantes para la cadena pesada y ligera quiméricas (Región variable murina y regiones constantes humanas) del anticuerpo llamado 5C10, que reconoce a la SMD de *L. reclusa* y *L. boneti*. Las construcciones se introdujeron en plásmidos independientes con los cuales células CHO serán transfectadas. La producción del mAb será evaluada en matraces agitados.

Resultados. La síntesis de proteínas se inicia por alguno de los distintos mecanismos conocidos: cap-dependiente y dependiente de IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) (4). La presencia de estos elementos favorece la traducción en diferentes niveles dependiendo de su

origen (5), por lo que se colocó la secuencia IRES de c-myc en la construcción de la cadena pesada, y la secuencia IRES de EMCV en la construcción de la cadena ligera para obtener una relación favorable de ambas cadenas y mejorar el ensamblaje del anticuerpo 5C10. Lo anterior basado en la regulación diferencial de ambos elementos, lo que modificará la concentración de cada cadena en el retículo endoplásmico. En la 5'UTR se añadió la secuencia KOZAC y una señal de secreción de la proteína recombinante (6) y en 3'UTR se agregó un elemento constitutivo de transporte (CTE) que favorecerá el transporte del mRNA del núcleo al citoplasma (7) (Figura 1).



Figura 1. Representación de las construcciones de la cadena pesada y ligera con los reguladores transcripcionales y traduccionales.

Conclusiones. Se diseñaron y construyeron secuencias codificantes para las cadenas pesada y ligera del anticuerpo 5C10 que contienen elementos reguladores de la traducción y de la transcripción. Esto con la finalidad de lograr una expresión diferencial entre cadena pesada y ligera cuando sean expresadas en células CHO favoreciendo el procesamiento, estructuración y secreción del anticuerpo.

Agradecimiento. Proyecto 104951-Z SEP-CONACyT. Beca de maestría CONACyT.

Bibliografía.

- Desai, P., Shrivastava, N. y Padh, H. (2010). *Biotechnol Adv.* 28: 427-435
- Wurm, F. M. (2004). *Nat Biotechnol.* 22: 1393-1398.
- Birch, J. y Racher, J. (2006). *Adv Drug Delivery Rev.* 58: 671-685
- Gutiérrez, E. A. L. (2006). *REB. UNAM.* 25: 12-19.
- Masterton R. J., Roobol, A., Al-Fagee, M. B., Carden, M. J. y Smales, C. M. (2009). *Biotechnol Bioeng.* 105: 215-220.
- Young, R. y Rance, J. (2010). *Patent Application Publication US 2010/0240097 A1.*
- Taberero, C., Zolotukhin, A. S., Valentin, A., Pavlakis, G. N., y Felber, B. K. (1996). *J Vir.* 70: 5998-6011