



Expresión y purificación de la hormona folículo estimulante bovina (bFSH) en un sistema eucariota alternativo.

Tesis para la obtención del título de Magíster en Biotecnología

Ing. Karin Grunberg

Orientadora: Dra. Mariela Bollati-Fogolín

Co-orientadores: Dra. Cecilia Abreu, Dr. Marcelo Comini

Tribunal de tesis:

Dra. Andrea Villarino

Dra. Leticia Pérez

Dr. Agustín Correa

Montevideo, Uruguay

Diciembre 2022

La presente tesis de maestría fue desarrollada en el marco de un Acuerdo de Cooperación Específico entre el Institut Pasteur de Montevideo y Biogénesis Bagó Uruguay S.A. por lo que los datos mostrados son confidenciales.

Agradecimientos

- Proyecto Alianza (ALI 1_2015_1_5084)
- Beca de maestría ANII (POS_NAC_2018_1_151690)
- Postgrado en Biotecnología por el apoyo a tesis.
- Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas y la Unidad de Proteínas Recombinantes del Institut Pasteur de Montevideo.

Índice

1	Introducción	5
1.1	Hormona folículo estimulante	5
1.1.1	Mecanismo de acción de la FSH	6
1.1.2	FSH utilizada en técnicas de biotecnología reproductiva	9
1.1.3	FSH recombinante	10
1.1.4	Glicosilación de la FSH	13
1.1.5	Métodos de administración	15
1.1.6	Bioensayos para determinar actividad FSH	16
1.2	<i>Leishmania</i> : un sistema alternativo de expresión de proteínas.	16
1.2.1	<i>Leishmania tarentolae</i>	18
1.2.2	Modificaciones post-traduccionales	19
1.2.3	Regulación de la expresión génica en <i>Leishmania</i>	21
1.2.4	Expresión heteróloga en <i>L. tarentolae</i>	22
2	Hipótesis y Objetivos	28
2.1	Hipótesis.....	28
2.2	Objetivo general.....	28
2.3	Objetivos específicos.....	28
3	Metodología	29
3.1	Materiales	29
3.2	Métodos	29
3.2.1	Diseño y generación de los plásmidos para expresión de bFSH.	29
3.2.2	Obtención de clones estables de <i>L. tarentolae</i> productores de bFSH	32
3.2.3	Expresión y purificación de bFSH	35
3.2.4	Herramientas informáticas	38
3.2.5	Procedimientos analíticos para la detección, identidad, calidad y conformación de la bFSH recombinante	38
3.2.6	Ensayos de actividad biológica	43
4	Resultados y discusión	48
4.1	Diseño de vectores de expresión para <i>L. tarentolae</i>	48
4.2	Obtención de clones estables de <i>L. tarentolae</i> inducible bFSH_His-Tag (<i>L. tarentolae</i> T7-TR bFSH_HisTag_pLEXSY_IE-blecherry4).....	48
4.3	Expresión de bFSH	51
4.3.1	Optimización de las condiciones de cultivo y evaluación de la cinética de inducción de <i>L. tarentolae</i> productora de bFSH a escala de laboratorio.	51

4.4 Escalado de la producción de bFSH en un biorreactor	53
4.5 Purificación de bFSH.....	60
4.5.1 Purificación mediante cromatografía de intercambio catiónico.	60
4.5.2 Purificación mediante cromatografía de intercambio aniónico y catiónico.	61
4.5.3 Purificación mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC).	63
4.6 Determinación de la actividad biológica de FSH	69
4.6.1. Optimización de la valoración biológica <i>in vitro</i> utilizando preparados comerciales.	69
4.6.2 Evaluación de la actividad biológica <i>in vitro</i> de bFSH producida en <i>L. tarentolae</i> y purificada por IMAC.	71
4.6.3 Actividad biológica <i>in vitro</i> de bFSH producida por <i>L. tarentolae</i>, purificada por IMAC e Intercambio catiónico.....	72
4.6.4 Optimización de la purificación por cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) empleando lavados con mayor concentración de imidazol.....	75
4.6.5 Ensayos de Actividad biológica <i>in vivo</i>	76
4.7 Caracterización bioquímica de la bFSH recombinante producida en <i>L. tarentolae</i>	79
4.7.1 Cromatografía de exclusión molecular	79
4.7.2 Análisis del patrón de glicosilación e identificación de sitios glicosilados	81
4.7.3 Pruebas de estabilidad de la bFSH	87
4.8 Estrategias para reducir costos en la producción de bFSH en <i>L. tarentolae</i> y empleo de medios libres de componentes animales.....	90
4.8.1 Generación de la línea para expresión constitutiva bFSH_His-Tag (<i>L. tarentolae</i> LOC bFSH_HisTag_pLEXSY_Hyg2)	91
4.8.2 Generación de línea inducible bFSH_2XStrep-Tag (<i>L. tarentolae</i> T7-TR bFSH_2X StrepTag_pLEXSY_IE-blecherry4)	94
4.8.3 Evaluación del medio de cultivo de origen vegetal Vegitona	97
5 Conclusiones y Perspectivas:.....	99
6 Referencias.....	102
7 Anexos	112

1 Introducción

Cada vez es mayor la aplicación de la biotecnología a la salud animal. El uso de moléculas biológicas se ha extendido desde la inmunoprofilaxis para el control de enfermedades infecciosas¹, hasta llegar a la inmunocastración^{2,3} y el incremento de la capacidad reproductiva^{4,5}. La producción industrial de ganado para consumo de carne y otros productos (leche, lana, etc.) está hoy en día estrechamente ligada a la eficacia de las biotecnologías reproductivas (inseminación artificial y superovulación). En éstas se emplea hormonas de la reproducción (ej. hormona folículo estimulante), las cuales son empleadas para estimular la función ovárica de las hembras con el fin de incrementar la probabilidad de la fecundación. Actualmente, las hormonas reproductivas disponibles en el mercado se obtienen de fuentes naturales lo cual trae asociados problemas de estabilidad, baja y variable potencia biológica, riesgo de contaminación con agentes adventicios y alto costo de producción, entre otros. Estos y otros inconvenientes asociados a cuestiones de ética en la manipulación de animales con fines extractivos genera una demanda de bioproductos recombinantes de alta calidad, homogeneidad y seguridad biológica.

1.1 Hormona folículo estimulante

La hormona folículo estimulante (FSH), secretada por la glándula pituitaria, es una glicoproteína central en la regulación de la reproducción de los mamíferos. Ejerce su acción al unirse a sus receptores específicos localizados en las células de la granulosa del ovario y en las células de Sertoli en los testículos y participa en la regulación de varios procesos reproductivos esenciales, como la gametogénesis, el crecimiento folicular y la ovulación⁶⁻⁸. La FSH pertenece a la familia de hormonas glicoproteicas, que incluye a la hormona luteinizante (LH), gonadotropina coriónica (CG) y hormona estimulante de tiroides (TSH)^{7,9-13}. Estas hormonas glicoproteicas consisten en heterodímeros asociados de forma no covalente, compuestos de una subunidad α común a todas ellas y una subunidad β distintiva de cada hormona que le confiere especificidad de unión al receptor hormonal^{6,8,9,12}. Si bien las subunidades no están asociadas de forma covalente, la configuración de cada subunidad está estabilizada por varios puentes

disulfuro intracatenarios. En la FSH bovina en particular la subunidad α presenta cinco puentes de disulfuro intracatenarios, mientras que la subunidad β presenta seis puentes de disulfuro ^{6,11,14}. Ambas subunidades contienen varios sitios de N-glicosilación, influyendo estas modificaciones en el plegamiento, ensamblaje, secreción, y actividad biológica de la hormona. Las diferentes estructuras de oligosacáridos con distinto grado de sulfatación y sialilación, dan lugar a una gran variedad de isoformas ⁷. La estructura tridimensional de la FSH humana fue determinada por cristalografía de rayos X (PDB: 1FL7) ¹⁵, en la **Figura 1** se muestra una representación de la misma. Si bien no está determinada la estructura para otras especies de mamífero, los residuos de cisteína que forman los disulfuros intracatenarios están conservados en las diferentes especies, lo que sugiere que la hormona tendría una estructura tridimensional similar ^{7,16}.

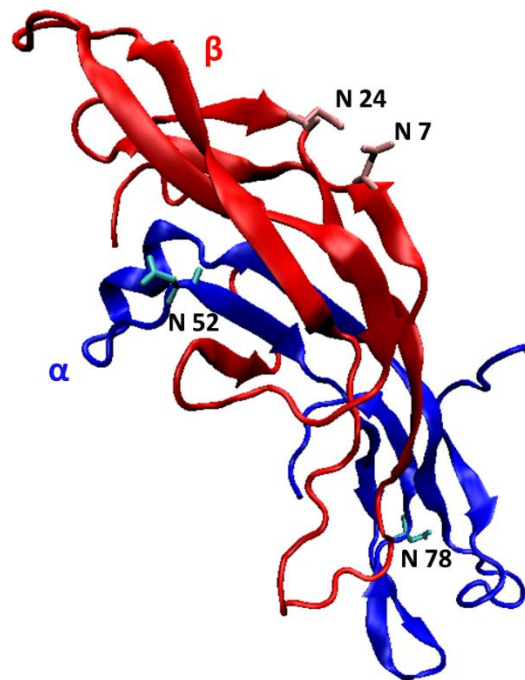


Figura 1. Representación de la estructura tridimensionales de la hFSH (PDB: 1FL7). En azul se muestra la subunidad α y en rojo la subunidad β . Se indican con la letra N las asparaginas correspondientes a los sitios de N-glicosilación.

1.1.1 Mecanismo de acción de la FSH

El proceso reproductivo en los mamíferos es el resultado de complejas interacciones entre el hipotálamo, la hipófisis y las gónadas. El principal producto de secreción del hipotálamo relacionado con la reproducción es el factor liberador de gonadotrofinas,

GnRH. Este factor al ser secretado estimula la síntesis y secreción de FSH y LH, lo cual es modulado por hormonas esteroideas como el estradiol, progesterona y testosterona, así como también hormonas peptídicas como inhibinas y activinas ^{17,18} **(Figura 2)**.

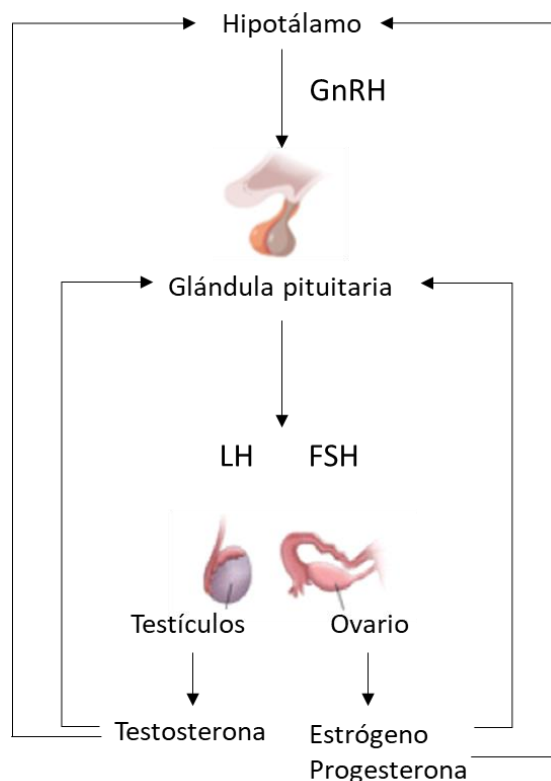


Figura 2. Regulación del eje Hipotálamo-Hipofiso-Gonadal. La secreción de LH y FSH es regulada por la secreción de GnRH y de péptidos y esteroides.

El evento inicial de la acción de las hormonas glicoproteicas se da al unirse a su receptor altamente específico localizado en la membrana de las células blanco. El receptor de la FSH (FSH-R) pertenece a la superfamilia de los receptores acoplados a proteína G (GPCR) y a la subfamilia de GPCR que se caracteriza por tener un dominio extracelular con múltiples repetidos ricos en leucina y un dominio tipo rodopsina con 7 hélices transmembrana (7TM) ^{7,19,20}. El dominio extracelular del receptor es responsable de la unión al ligando con alta afinidad y el dominio transmembrana es responsable de la activación del receptor y la transducción de la señal a través de la proteína G. La unión de la FSH a su receptor genera un cambio en el dominio 7TM que se propaga a través de la membrana provocando el intercambio de nucleótidos de guanina en la proteína heterotrimérica Gs. Se induce la activación de adenilil ciclasa y por lo tanto aumenta la producción de Adenosin monofosfato cíclico (AMPc) ^{7,19,20}. El aumento de AMPc provoca

la activación de la proteína quinasa A (PKA), la fosforilación de la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB) y finalmente la transcripción de varios genes, dentro de los que se encuentra inhibina A, inhibina B, receptor de FSH y citocromo p450 aromatasa. La FSH también promueve la rápida activación de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), lo que resulta en la fosforilación y activación de la proteína quinasa B (AKT) y del factor de transcripción de Forkhead (FOXO1). La unión de FSH a su receptor también provoca un aumento en el Ca^{2+} por la despolarización de los canales de Ca. El aumento de Ca^{2+} regula la calmodulina quinasa que a su vez modula diversos efectores *downstream*. También se ha demostrado que la FSH modula las rutas PLA, Erk, p38 MAPK y PI3K. El FSH-R activado es fosforilado por BARK, que a su vez recluta β -arrestina y conduce a una regulación a la baja de FSH-R, además la β -arrestina puede activar de manera independiente la vía de Erk (Figura 3) ^{21,22}.

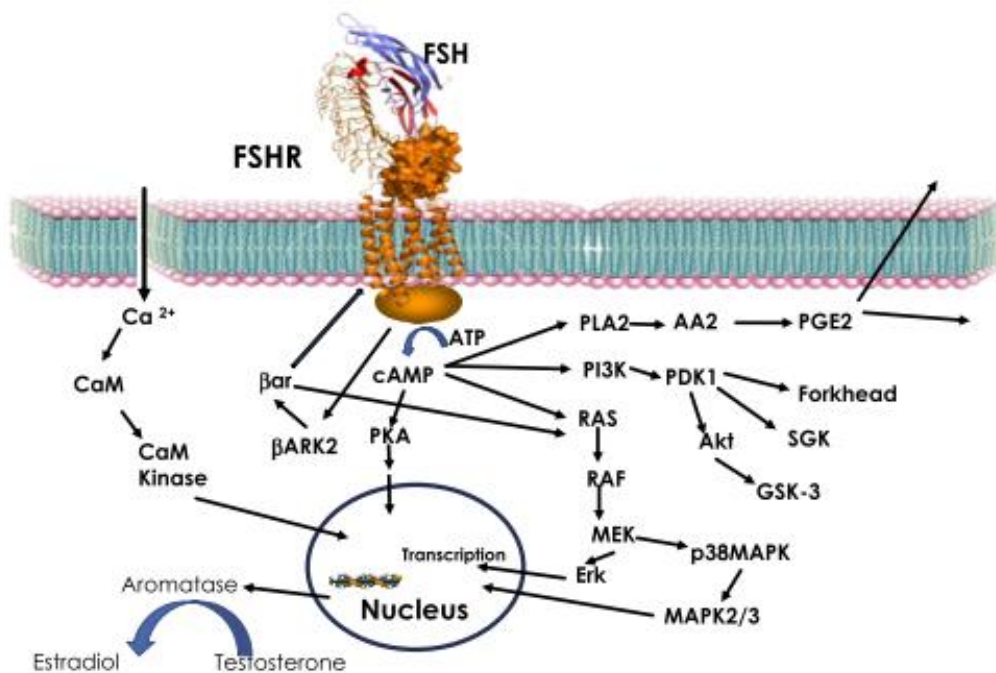


Figura 3. Vías de señalización de FSH. La activación del FSH-R produce un aumento de AMPc intracelular, que activa a PKA, la cual regula la expresión de varios genes a través de la fosforilación de factores de transcripción como CREB. La unión de FSH a su receptor también provoca un aumento en el Ca^{2+} y la Calmodulina por la despolarización de los canales de Ca. El aumento de Ca^{2+} regula la CaM quinasa que a modula la actividad de los diversos efectores de la transcripción. Tomado de Nataraja *et al.* ²¹

1.1.2 FSH utilizada en técnicas de biotecnología reproductiva

La FSH es ampliamente utilizada en protocolos de reproducción asistida en animales productivos. Una de ellos es la transferencia de embriones donde los embriones (óvulos fertilizados) son colectados del cuerno uterino de la hembra antes de la nidación (donante), y transferidos al cuerno uterino de otras hembras para completar su gestación (receptoras). Esta técnica permite una mayor producción de crías de hembras genéticamente superiores en el menor tiempo posible, permitiendo así mantener la genética de los mejores bovinos en la industria cárnica y láctea. La transferencia embrionaria consiste de diferentes etapas como ser: selección de una hembra donante de alto valor genético, superovulación, inseminación, recolección y evaluación de embriones, selección y preparación de hembras receptoras, transferencia de embriones y finalmente, la evaluación del trasplante del embrión ^{6,12,14,23–25}.

El principal objetivo de un tratamiento superovulatorio en ganado es inducir una mayor cantidad de ovulaciones que darán como resultado una mayor cantidad de embriones transferibles ²⁶. Durante la superovulación se estimula el desarrollo folicular mediante el tratamiento hormonal y se induce la ovulación de varios folículos de forma simultánea. Por reproducción natural, una vaca puede criar un ternero por año, alcanzando un promedio de ocho a diez terneros en toda su vida. Con un tratamiento hormonal adecuado de superovulación, una vaca puede liberar hasta diez o más óvulos en cada celo, disminuyendo el intervalo generacional y aumentando el potencial genético y la producción de ganado ⁶.

La inducción a la superovulación se realiza con diferentes preparaciones hormonales que provienen de fuentes naturales, entre las que se encuentran el extracto de glándula pituitaria de origen porcino con actividad FSH y la gonadotrofina coriónica equina extraída de suero de yeguas preñadas (eCG o PMSG) ^{6,8,25–28}.

La FSH extraída de glándula pituitaria porcina, debido a su corta vida media en plasma, requiere de múltiples inyecciones (dos veces por día durante 4 días) para obtener una adecuada respuesta superovulatoria, mientras que la eCG, con una mayor vida media, produce estimulación ovárica con una única administración. Sin embargo, esta estimulación ovárica prolongada afecta la calidad de los embriones provocando una

disminución del porcentaje de embriones transferibles ^{12,14,24–27,29}. Siendo en ocasiones requerida la administración de sueros anti-eCG durante el período post-ovulatorio ¹⁴.

A pesar de ser una práctica generalizada, la purificación de FSH partir de glándulas pituitarias tiene importantes problemas asociados, tales como: (i) variabilidad de actividad biológica y pureza entre lotes que dan lugar a variaciones en las respuestas superovulatorias entre animales, (ii) la posible contaminación con agentes infecciosos como virus, bacterias y priones y (iii) problemas de pureza por presencia de otras hormonas (por ejemplo LH) en la muestra ^{8,9,12,14,24,26,30}. Administrar LH al inicio del protocolo de superovulación puede llevar a la activación temprana de su receptor, resultando en una ovulación anticipada de los folículos y en última instancia a una disminución de la tasa de producción de embriones. A su vez la presencia de LH puede interferir con la efectividad de la FSH ^{12,25}. También se ha descrito que las gonadotropinas de origen equino o porcino pueden inducir una respuesta inmune que impide el uso repetido de estas preparaciones en ovejas y vacas ¹⁴.

En este contexto, la producción de hormonas recombinantes aparece como una solución atractiva para superar los inconvenientes mencionados anteriormente ^{8,9,12,14}.

1.1.3 FSH recombinante

La FSH de distintas especies se ha producido de forma recombinante utilizando diferentes sistemas de expresión como ser levadura, líneas celulares de mamífero, células de insecto, plantas, glándula mamaria de ratones y de conejo. En la **Tabla 1** se muestran algunos ejemplos para FSH humana, bovina, equina y ovina producidas de forma recombinante.

Las células de hámster de ovario (CHO) son muy utilizadas en la industria para la producción de la mayoría de los bioterapéuticos disponibles comercialmente debido a que realizan diversas modificaciones post-traduccionales sobre las proteínas de interés y su crecimiento *in vitro* estudiado ampliamente ³¹. Como se observa en la **Tabla 1**, esta línea celular ha sido seleccionada para la producción de FSH recombinante por diferentes empresas ¹².

Tabla 1: Sistemas de expresión heterólogos utilizados para producción de FSH

Origen de la FSH (Nombre comercial)	Sistema de expresión	Referencia/Empresa
Humano (Follistim AQ)	CHO (células de mamífero)	Organon USA Inc
Humano (Puregon)	CHO (células de mamífero)	Vetter Pharma GmbH
Humano (Gonal-F)	CHO (células de mamífero)	EMD Serono
Bovino (BoviPureFSH)	CHO (células de mamífero)	AspenBio Pharma, inc
Equino (EquiPureFSH)	CHO (células de mamífero)	AspenBio Pharma, inc
Humano	HEK* (células de mamífero)	Nanocore Biotecnología
Bovino	<i>Hansenula polymorpha</i> (levadura)	Weidong <i>et al</i> ³²
Ovino	<i>Pichia pastoris</i> (levadura)	Fidler <i>et al</i> ³³
Bovino	SF21** (células de insecto)	Van de Wiel <i>et al</i> ³⁴
Bovino	<i>Nicotiana benthamiana</i> (plantas)	Dirnberger <i>et al</i> ³⁵
Bovino	Leche de ratón transgénico	Greenberg <i>et al</i> ³⁶
Bovino	Leche de conejo transgénico	Coulibaly <i>et al</i> ⁹

*HEK: línea celular derivada de riñón embrionario humano, ** SF21: línea celular derivada de ovario pupal de la oruga *Spodoptera frugiperda*

Inicialmente, la FSH recombinante se producía expresando sus dos subunidades por separado. Posteriormente, se estudió la expresión de construcciones conteniendo ambas subunidades proteicas fusionadas, lo que facilitaba su producción y purificación ^{8,9,12,28,34}. Subsecuentemente, las investigaciones se centraron en aumentar su vida media en el organismo y así poder reducir el número de inyecciones requeridas en los protocolos de superovulación. Un ejemplo de esto es la adición del CTP (péptido carboxilo terminal de la hCG) en un extremo de la FSH humana recombinante, dando lugar a la quimera hFSH-CTP. Se demostró que el CTP aumentó entre cuatro a diez veces la vida media de la FSH en humanos. Con una única dosis de hFSH-CTP se obtuvo maduración folicular comparable a cuatro inyecciones de hFSH derivada de hipófisis y administrada en intervalos de 12 h ^{12,13}. El mayor tiempo de vida media en circulación puede deberse a los residuos de ácido siálico con carga negativa adicional incorporados en las O-glicosilaciones del CTP ¹².

Si bien la FSH bovina (bFSH) se produjo de forma activa en células CHO, los niveles de expresión alcanzados no fueron suficientemente altos para permitir su explotación comercial ¹². Como se muestra en la **Tabla 2** otros sistemas de expresión para la producción de bFSH se han explorado, pero ninguno ha mostrado rendimiento y

actividad biológica superior a la producción en células CHO. Según búsqueda bibliográfica reciente, la versión de bFSH producida en CHO y patentada bajo el nombre BoviPureFSH™, donde se expresan la subunidad β y α fusionadas por el CTP, no se encuentra comercialmente disponible. Tampoco lo están las versiones recombinantes de la FSH ovina (roFSH) y bovina (bscrFSH) con actividad estimulante de larga duración que recientemente mostraron su eficacia en ovinos y bovinos ^{37–39}. Esta actividad prolongada en el tiempo de las hormonas se logró mediante la incorporación de nuevos sitios de N-glicosilación en la secuencia de la proteína, logrando superovulación en niveles similares a los tratamientos convencionales, pero con menos inyecciones. Sin embargo, ninguno de estos productos ha llegado al mercado, probablemente debido a sus altos costos de producción.

Tabla 2. Producción de FSH bovina en sistemas heterólogos

Año	Sistema de expresión	Rendimiento	Observaciones (UI=unidades Internacionales)	Referencia/Empresa
1993	CHO	NI	Presentó actividad <i>in vivo</i>	Wilson <i>et al</i> ²⁸
1991	Leche de ratón transgénico	15 µg/mL (purificado)	Subunidades α y β por separado. Actividad <i>in vitro</i> (60 UI/mL)	Greenberg <i>et al</i> ³⁶
1998	Sf21 (células de insecto)	1–5 µg/mL (purificado)	Subunidades α y β por separado. Actividad <i>in vitro</i> (6–22 UI/mL). No sialidada	Van de Wiel <i>et al</i> ³⁴
2001	<i>Nicotiana benthamiana</i> (planta)	20 µg/mL (sin purificar)	Subunidades α y β fusionadas. Actividad <i>in vitro</i> (17 UI/mL). No sialidada	Dirnberger <i>et al</i> ³⁵
2002	Leche de conejo transgénico	50 µg/mL (sin purificar)	Subunidades α y β por separado. Actividad <i>in vitro</i> (85 UI/mL). Sialidada	Coulibaly <i>et al</i> ⁹
2009	<i>Hansenula polymorpha</i> (levadura)	5 mg/L (sin purificar) 3 mg/mL (purificado)	Subunidades α y β por separado. Actividad <i>in vitro</i> (60 UI/mL)	Weidong <i>et al</i> ³²
2013	CHO	NI	β -CTP- α . Activa <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	AspenBio Pharma, inc BovipureFSH

NI: no indicado

A pesar de los avances realizados en el campo de las proteínas recombinantes, los procesos de producción y procesamiento (*downstream*), tienen costos asociados importantes. Esto es una limitante para la producción de proteínas recombinantes de uso animal, donde el desarrollo de productos y estrategias de bajo costo que permitan

que su comercialización sea rentable es una prioridad. Igualmente, el uso de proteínas recombinantes en animales ha aumentado en las últimas décadas, siendo los bioproductos relacionados al sistema endocrino uno de los campos más estudiados ¹².

1.1.4 Glicosilación de la FSH

La razón principal por la que la producción de gonadotrofinas recombinantes en forma económica y con alta calidad se ha visto limitada es el hecho que estas moléculas requieren de modificaciones post-traduccionales, principalmente la glicosilación, para ser funcionalmente activas ^{8,12}.

La glicosilación es la modificación más común y compleja de muchas proteínas eucariotas secretadas. La adición enzimática de oligosacáridos a las cadenas de polipéptidos nacientes comienza en el retículo endoplásmico (RE). La estructura de los oligosacáridos unidos es modificada por glicosidasas y glicosiltransferasas en el interior de este órgano y del aparato de Golgi. Las reacciones de modificación que ocurren en el RE están altamente conservadas entre eucariotas inferiores y superiores. Mientras que las modificaciones que tienen lugar dentro del complejo de Golgi varían entre especies y tipos de células ^{40,41}.

Los carbohidratos son componentes estructurales importantes de la FSH que pueden representar hasta un 30% de su masa molecular ⁴². En la **Figura 4** se muestran ejemplos de estructuras de glicanos presentes en residuos de asparagina de FSH ovina, bovina y humana.

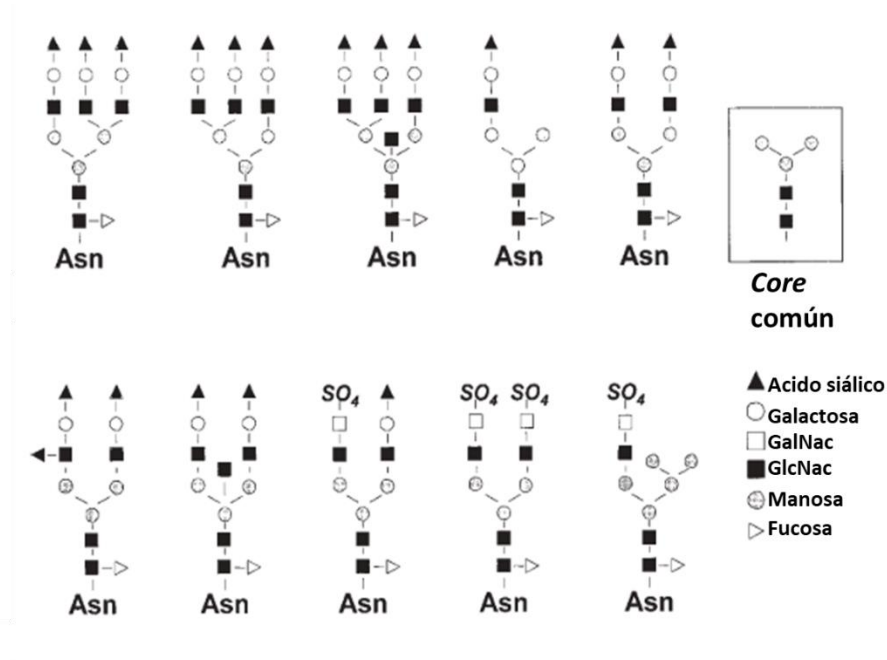


Figura 4. N-glicanos presentes en FSH ovina, bovina y humana. Sólo se muestran estructuras completas, aunque a nivel biológico pueden encontrarse también versiones de glicanos procesados de forma incompleta, en general sin los componentes terminales como el sulfato, el ácido siálico y la fucosa. Editada de Ulloa-Aguirre *et al.* ⁷.

Al igual que en muchas hormonas glicoproteicas, la glicosilación influye en varios procesos intra y extracelulares, incluido el correcto plegamiento, ensamblaje del dímero, secreción, y capacidad de estimular su receptor e inducir la transducción de señales. También contribuye a reducir el *clearance* metabólico por aumentar el tamaño molecular y la carga de la proteína blanca. Durante el proceso de glicosilación de la FSH se producen isoformas con diferentes propiedades isoeléctricas, pesos moleculares y bioactividad, principalmente debido a la variedad de glicanos y contenido de ácido siálico que podrían incorporarse. La sialidación produce isoformas ácidas con vidas medias más largas *in vivo* que las isoformas más básicas, debido a que la incorporación de cargas negativas disminuye la filtración glomerular por el riñón aumentando el tiempo de depuración ^{12,13,43,44}. A su vez la glicosilación es también importante en el reconocimiento del receptor. Se ha demostrado que FSH deglicosilada químicamente puede actuar como antagonista del receptor de FSH, posiblemente debido a que esta isoforma tiene afinidad aumentada por el receptor pero no es capaz de inducir la transducción de la señal ^{7,12,45}.

En cuanto al rol de los distintos sitios de N-glicosilación se ha evidenciado que los glicanos presentes en la subunidad α son críticos para la formación del dímero, integridad, secreción y transducción de la señal, mientras que los glicanos presentes en la subunidad β juegan un rol fundamental en el *clearance* metabólico y en la vida media ^{6,7,16}. Está reportado que la hFSH recombinante con la subunidad β sin glicosilar es eliminada de circulación diez veces más rápido que la hFSH glicosilada y carece de actividad *in vivo* ⁴⁶.

1.1.5 Métodos de administración

Paralelamente a la búsqueda de gonadotrofinas recombinantes que exhiban tiempos de circulación y retención *in vivo* más extensos, se han investigado distintas formulaciones que permitan disminuir el número de inyecciones. Una de ellas consiste en utilizar adyuvantes que permiten una liberación lenta de FSH en el tiempo, de forma tal de inducir una respuesta superovulatoria similar a las inyecciones múltiples que tradicionalmente se realizan. La FSH administrada en forma subcutánea se elimina rápidamente de la circulación, siendo indetectable en plasma 12 h después de la inyección. Sin embargo, luego de la inyección intramuscular de FSH porcina disuelta en gel de hidróxido de aluminio, el cual es ampliamente utilizado como adyuvante, se detectó FSH en plasma de bovinos hasta 4 días después de la administración ^{47,48}.

Como alternativa al hidróxido de aluminio se ha reportado la utilización de polímeros de origen biológico o sintético con diferentes propiedades que facilitan la liberación sostenida del fármaco. Estos compuestos son biodegradables y no son reactivos en los tejidos, lo que facilita su uso en animales. Uno de estos compuestos es una formulación de liberación lenta basada en ácido hialurónico ²⁶.

En otro estudio, propusieron el uso de la fracción constante (Fc) de la inmunoglobulina G (IgG) como transportador de proteínas terapéuticas a través de las barreras epiteliales y como forma de aumentar la vida media de la molécula. Los autores de este trabajo demostraron que la FSH unida al dominio Fc de IgG retuvo su actividad biológica *in vivo* después del transporte a través de las células epiteliales intestinales, introduciendo así la posibilidad de una administración oral ⁴⁹.

1.1.6 Bioensayos para determinar actividad FSH

El desarrollo de métodos de detección y cuantificación es clave para caracterizar cuali y cuantitativamente el funcionamiento de las hormonas. Respecto a los métodos de detección de actividad biológica de FSH *in vivo*, el más utilizado y único aprobado por farmacopea es el desarrollado por Steelman y Pohley en 1953. El mismo consiste en medir el aumento del peso de los ovarios de ratas inmaduras luego de suministrar la hormona a diferentes concentraciones dentro del rango donde la relación entre la dosis administrada de FSH y el peso de los ovarios es lineal ⁵⁰. Este ensayo es laborioso y requiere una gran cantidad de animales que deben hallarse en una etapa específica de su desarrollo.

Como alternativa al ensayo *in vivo*, se ha desarrollado varios ensayos *in vitro* que detectan diferentes puntos finales específicos de la acción de la FSH, como por ejemplo la activación de segundos mensajeros o la producción de esteroides. Numerosos bioensayos emplean células de la granulosa para los cuales se monitorea la producción de progesterona y estradiol o la actividad de la enzima aromatasa, la cual participa en la síntesis de estradiol, todo ello inducido por acción de la FSH ⁵¹. Otro modelo celular para estos ensayos lo constituyen las células de Sertoli, donde también se monitorea la producción de estrógeno y la actividad aromatasa. Posteriormente, se desarrollaron métodos basados en líneas celulares que expresan de forma estable el receptor de la FSH y a los cuales se acopla la detección de los niveles de AMPc. Estos métodos permiten evitar el uso de animales así como simplificar el proceso y mejorar la reproducibilidad ⁵².

1.2 *Leishmania*: un sistema alternativo de expresión de proteínas.

Los parásitos protozoarios eucariotas del género *Leishmania* pertenecen al orden de los kinetoplástidos y a la familia de los tripanosomátidos. Esta familia comprende organismos unicelulares caracterizados por ser mótils debido a la presencia de un solo flagelo y por poseer una única mitocondria llamada kinetoplasto donde se aloja el ADN mitocondrial altamente condensado ⁵³⁻⁵⁵. Presentan un ciclo de vida complejo que alterna entre dos formas. En el caso de los organismos del género *Leishmania*, la forma extracelular flagelada promastigota, se desarrolla en el intestino del hospedero

invertebrado, mientras que la forma intracelular aflagelada o amastigota, se replica en los macrófagos del hospedador vertebrado ^{53,56–58}.

Más de 20 especies de *Leishmania* se han reportado como causantes de enfermedades tropicales de amplio espectro, llamadas de forma colectiva leishmaniasis ⁵³. Sin embargo, no todos los parásitos del género *Leishmania* infectan mamíferos, estas especies no patógenas se clasifican en el sub-género *Sauroleishmania* y fueron descubiertas en lagartos, los cuales representan su principal huésped y carecen de reservorios en mamíferos ^{53,59}. Algunas de estas especies de *Leishmania* son *L. adleri*, *L. tarentolae*, *L. hoogstraali* y *L. agamae*. Siendo *L. tarentolae* la más estudiada.

En cuanto al metabolismo, el estadio promastigota de leishmania es el que se ha estudiado con más profundidad.^{60,61}

En condiciones óptimas de crecimiento, la principal fuente de carbono para un promastigota es la glucosa y el aspartato en forma más limitada. Adicionalmente, aminoácidos y ácidos grasos son absorbidos también, pero no incorporados en el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA)⁶².

La glucosa es utilizada en la glucólisis, la vía de las pentosas fosfato y para la vía de fermentación del succinato, y los productos derivados, acetil-CoA y malato, en el ciclo del TCA. La principal fuente de ATP es la cadena respiratoria^{62,63}.

Leishmania es auxotrófica para muchos nutrientes, incluidos aminoácidos específicos, vitaminas o purinas. En casos, la absorción y las rutas biosintéticas de novo se superponen ^{60,64}.

Metabolismo del hierro en la infección de *Leishmania*:

Está demostrado que la adquisición de hierro es esencial para la patogenicidad de leishmania. Estos parásitos presentan sistemas de adquisición de hierro muy eficientes, los cuales son esenciales para su crecimiento celular. En este sentido, existen estudios que sostienen que la falta de hierro podría ser una estrategia eficaz para el control de infecciones ⁶⁵.

Al igual que muchos otros patógenos intracelulares, leishmania también cuenta con diversos mecanismos de adquisición de hierro y son capaces de utilizar varias fuentes

de hierro. El crecimiento de leishmania también se puede apoyar por el hierro derivado del hemo. A su vez el grupo hemo funcional es esencial en varias enzimas, involucradas en funciones celulares críticas. Sin embargo, leishmania carece de una vía biosintética completa del hemo y solo puede realizar los tres últimos pasos catalizados por la coproporfirinógeno oxidasa, la protoporfirinógeno oxidasa y la ferroquelatasa, localizadas en la mitocondria ⁶⁵.

1.2.1 *Leishmania tarentolae*

L. tarentolae es un parásito que infecta habitualmente a lagartos, en su mayoría geckos de la especie *Tarentolae annulae*. Fue aislada por primera vez de la especie *Tarentola mauritanica* ^{53,66}. El ciclo de vida de *L. tarentolae* tiene dos estadios diferenciables morfológicamente, el estadio promastigote y el amastigote. La forma promastigota posee una morfología fusiforme y monoflagelada ⁵⁴ (**Figura 5**), este estadio es el que coloniza al insecto y es el que se cultiva *in vitro*. En los últimos 30 años, *L. tarentolae* se ha utilizado para una amplia gama de aplicaciones biotecnológicas y biomédicas. En un comienzo se la utilizaba principalmente como modelo biológico para estudios de edición de ARN y amplificación de genes. Posteriormente se evaluó el uso de este parásito como vector biológico para la vacuna contra la leishmaniasis humana en modelos animales, como modelo celular para la identificación de fármacos antiparasitarios y como sistema para la producción de proteínas recombinantes ^{54,59,67,68}.

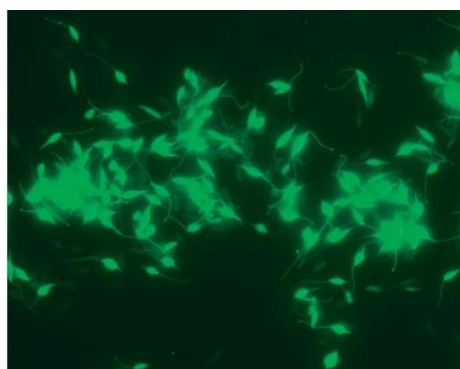


Figura 5. *Leishmania tarentolae* (promastigotes) en cultivo expresando proteína verde fluorescente mejorada (eGFP). Tomado de Hartmann *et al.* ⁶⁹

En cuanto a la producción de proteínas recombinantes, el sistema de *L. tarentolae* presenta varias ventajas que incluyen el fácil manejo de los cultivos, bajo requerimiento

nutricional, rápida tasa de crecimiento, obtención de altas densidades celulares, fácil adaptación a producciones a gran escala, disponibilidad de métodos para su manipulación genética y la maquinaria completa para realizar modificaciones post-traduccionales, incluyendo glicosilación, la cual suele ser muy uniforme y similar a la producida por mamífero ^{56,57,70–73}.

L. tarentolae puede cultivarse en medios complejos (a base de infusión de cerebro-corazón o extracto de levadura y extracto de soja) o medios definidos químicamente, ambos suplementados con hemina, que es esencial para el crecimiento y supervivencia de los promastigotes ya que son deficientes en la biosíntesis del hemo. La hemina es el derivado clorado de la molécula hemo y se produce tradicionalmente a partir de sangre bovina o porcina. Las células de *L. tarentolae* requieren condiciones aeróbicas para su desarrollo, pero no requieren el uso de suero ni incubación con CO₂. Las células son incubadas en la oscuridad a 26°C que es la temperatura óptima de crecimiento y pueden cultivarse en agitación o de forma estática ^{54,73–75}.

Los promastigotes crecen en suspensión y se dividen por fisión simple cada 4–6 horas cuando se cultivan con agitación, alcanzando altas densidades celulares, por encima de 4-5x10⁸ células/mL. Los cultivos para la expresión de proteínas se incuban en frascos tipo Erlenmeyer en agitador orbital y también es posible escalar el cultivo a biorreactores en condiciones más controladas, donde se logran alcanzar densidades de 1x10⁹ células/mL ^{54,73}.

En cuanto al rendimiento de proteína recombinante alcanzada en este sistema se han reportado producciones entre 0,1 a 30 mg/L ⁵⁴.

1.2.2 Modificaciones post-traduccionales

Además de los altos niveles de producción de proteína, la posibilidad de realizar modificaciones post-traduccionales (PTM) hacen a *L. tarentolae* un huésped atractivo para la producción de proteínas recombinantes de origen eucariota. Dentro de las PTM se incluye la N-glicosilación, fosforilación, acetilación y la prenilación, entre otras ⁶⁹.

Una de las PTM más importantes es la N-glicosilación, diversas proteínas necesitan de la glicosilación correcta para ser biológicamente activas. A su vez, la glicosilación implica el pasaje por el retículo endoplasmático, donde ocurren mecanismos de control de

calidad del estado de plegamiento de proteínas, aumenta la vida media y regula la interacción con los receptores celulares ^{54,76}.

Los tripanosomátidos son ricos en glicoproteínas, las mismas pueden representar un 10% del total de proteínas ⁷³. *L. tarentolae* se ha utilizado exitosamente para producir proteínas recombinantes N-glicosiladas y se ha visto que es capaz de O-glicosilar pero no de manera completa ⁷⁷. Se ha demostrado que *L. tarentolae* produce N-glicanos biantenarios de tipo eucariota superior con alta homogeneidad, en contraste con la mayoría de los hospedadores de expresión eucariotas alternativos (levadura, células de insectos) ^{54,74}. En el caso de los N-glicanos, se ha reportado la falta de los ácidos siálicos terminales (ácidos N-acetilneuramínicos) ⁵⁴. En la **Figura 6** se compara el perfil de glicosilación de proteínas recombinantes derivadas de *L. tarentolae*, plantas, levaduras, células de insecto y células de mamífero.

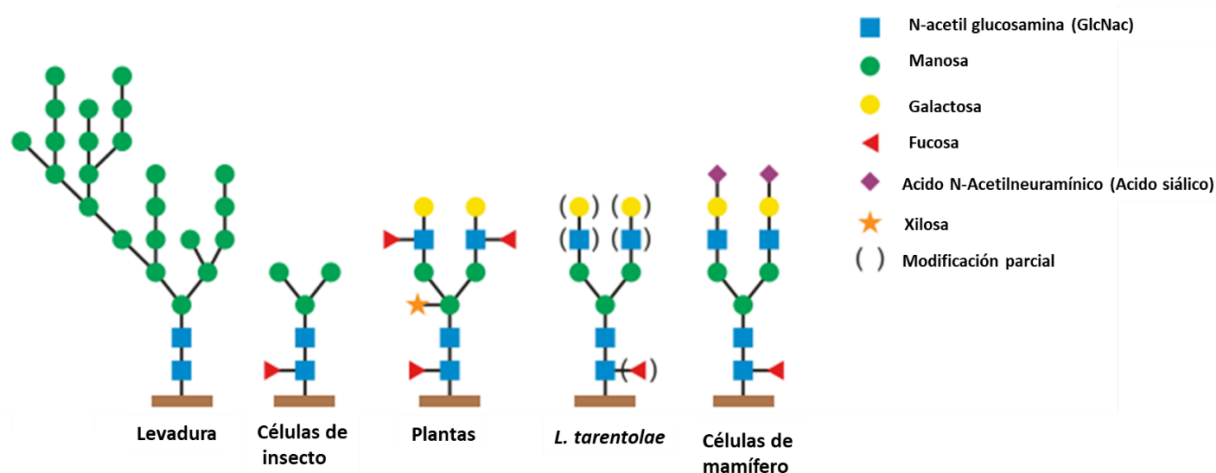


Figura 6. Patrón de N-glicosilación de proteínas producidas en diferentes sistemas de expresión. Imagen modificada de Jena Bioscience ⁷⁸.

Como un ejemplo de glicoproteína de uso terapéutico podemos citar el trabajo de Breitling y colaboradores, donde determinan el perfil de N-glicosilación de la eritropoyetina (EPO) recombinante humana producida en *L. tarentolae* y observan que éste era homogéneo, con N-glicanos biantenarios del tipo de eucariotas superiores con un core de Man3GlcNAc2. Los N-glicanos estaban completamente galactosilados y el core α -1, 6-fucosilado, mientras que la sialilación estaba ausente. No se observaron glicanos con mayores ramificaciones tri y tetra-antenarios, probablemente debido a la falta de actividad de N-acetilglucosaminil transferasa IV ⁷¹ (**Figura 7**).

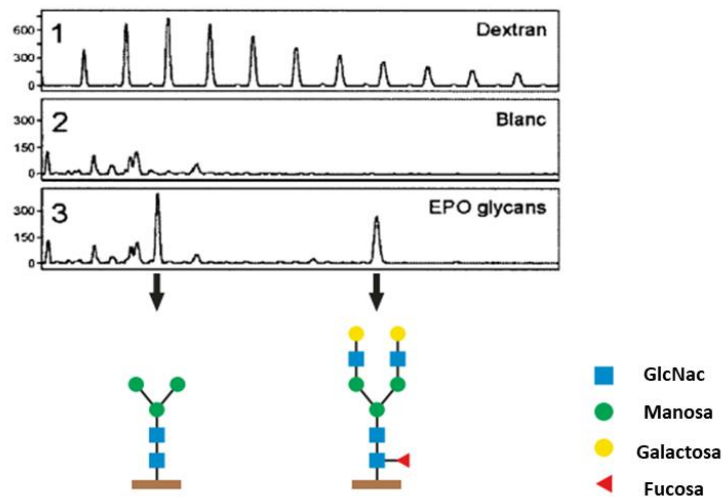


Figura 7. Análisis de glicanos de EPO producida en *L. tarentolae* ⁷¹

1.2.3 Regulación de la expresión génica en *Leishmania*

La regulación de la expresión génica en *Leishmania* tiene diferencias notables con otros eucariotas debido a la falta de intrones y secuencias promotoras consenso para la ARN polimerasa II ⁵⁹. Los genes de ARN ribosomales (ARNr) son los únicos genes con promotores conocidos, ya que son transcritos por la ARN polimerasa I ⁵⁵. Los genes transcritos por la ARN polimerasa II se transcriben como moléculas de ARN precursoras policistrónicas. El procesamiento post-transcripcional del pre-ARNm se da por un proceso de trans-splicing y poliadenilación (**Figura 8**). El trans-splicing consiste en la adición de un ARN de 39 nucleótidos conocido como SL (Splice Leader o mini-exon) al extremo 5' del ARN naciente, formando el cap 5' del ARNm. Previo al trans-splicing, al extremo 5' del ARN del SL se le agrega Cap4, importante para el direccionamiento al ribosoma e inicio de la traducción. Los sitios de adición del SL consisten en una región conservada de dinucleótido AG rodeada de tramos ricos en polipirimidinas. Las señales de poli (A) generalmente están dentro de los 100–300 nucleótidos aguas arriba del sitio de trans-splicing del siguiente gen. La presencia de la cola de poli (A), como en eucariotas superiores, es importante para la estabilidad del ARNm maduro. Las señales reguladoras necesarias para el procesamiento del ARNm son proporcionadas por regiones intergénicas no traducidas (UTR) o regiones intergénicas (IR) que flanquean los marcos abiertos de lectura (ORF) ^{54,55,59,79}. Por lo tanto la regulación de la expresión de proteínas ocurre de manera post-transcripcional a través de las UTR ⁵⁵. El trans-splicing desacopla

la transcripción de la traducción, permitiendo que el pre-ARNm sea transcripto por la pol I o polimerasas externas como las del bacteriófago T3 y T7 ⁸⁰.

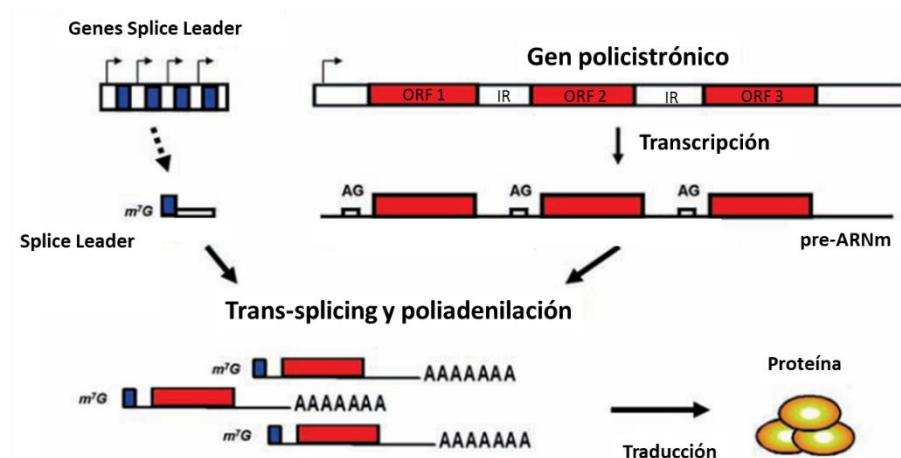


Figura 8. Transcripción en tripanosomátidos. AG, región dinucleótido conservada; m⁷G, estructura cap4. Modificada de Hartmann, M *et al.* ⁷⁹.

1.2.4 Expresión heteróloga en *L. tarentolae*

El sistema de expresión de *L. tarentolae* conocido como LEXSY es comercializado y distribuido por Jena Bioscience GmbH (<http://www.jenabioscience.com/>) ⁷².

En el sistema LEXSY la expresión de proteínas está disponible en dos configuraciones principales: constitutiva ⁷¹ o inducible ⁷⁰. La expresión heteróloga en *Leishmania* se puede lograr a través de secuencias codificantes extracromosomales (episomal) y cromosómicas integradas ⁵⁹. Se han desarrollado vectores de expresión integrativos constitutivos, integrativos inducibles y episomal inducibles que permiten la producción de proteínas recombinantes intracelulares o de secreción ^{54,73,81}.

En el caso del sistema integrativo constitutivo, los vectores están diseñados para su integración por recombinación homóloga en el locus cromosómico *ssu* que codifica para genes 18S del RNA ribosomales rRNA de *L. tarentolae*. Una vez que ocurre la inserción de este casete en el genoma, los genes de interés son transcriptos por la ARN polimerasa I del parásito (**Figura 9**).

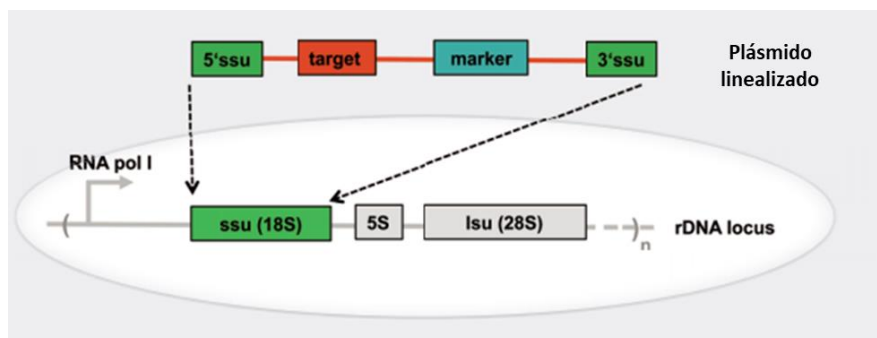


Figura 9. Arquitectura del sistema de expresión constitutivo LEXSY. Luego de la transfección, el plásmido linealizado con el gen de interés se integra en el gen 18S ARNr (*ssu*) por recombinação homóloga. La selección se realiza con marcadores de resistencia a antibiótico. Editada de Jena Bioscience ⁸².

El sistema de expresión inducible consiste en un vector donde la expresión del gen de interés está bajo el control de un promotor del bacteriófago T7 que lleva un operador de tetraciclina (op) y una cepa de *L. tarentolae* modificada genéticamente (llamada T7-TR). Esta cepa expresa constitutivamente la ARN polimerasa del bacteriófago T7 (T7 ARN pol), que va a transcribir la secuencia de interés (*target*), y una proteína represora TET (TR) que, al unirse al operador TET del vector de expresión, inhibe la transcripción génica (**Figura 10**). La expresión de la proteína recombinante es inducida por la adición de tetraciclina al medio de crecimiento, que se une a la TR desestabilizando así la unión de esta a la secuencia operadora de tetraciclina, permitiendo de esta forma la transcripción génica por la T7 ARN polimerasa ⁷⁴.

En el sistema integrativo inducible el gen de interés se integra en el locus cromosómico de ornitina descarboxilasa (*odc*). En el sistema inducible episomal los plásmidos son mantenidos como episomas extracromosomales autoreplicativos ^{54,55,59}. Los sistemas de expresión inducibles son valiosos cuando se tiene evidencia o sospechas que las proteínas heterólogas son tóxicas o afectan la fisiología del huésped ⁵⁵.

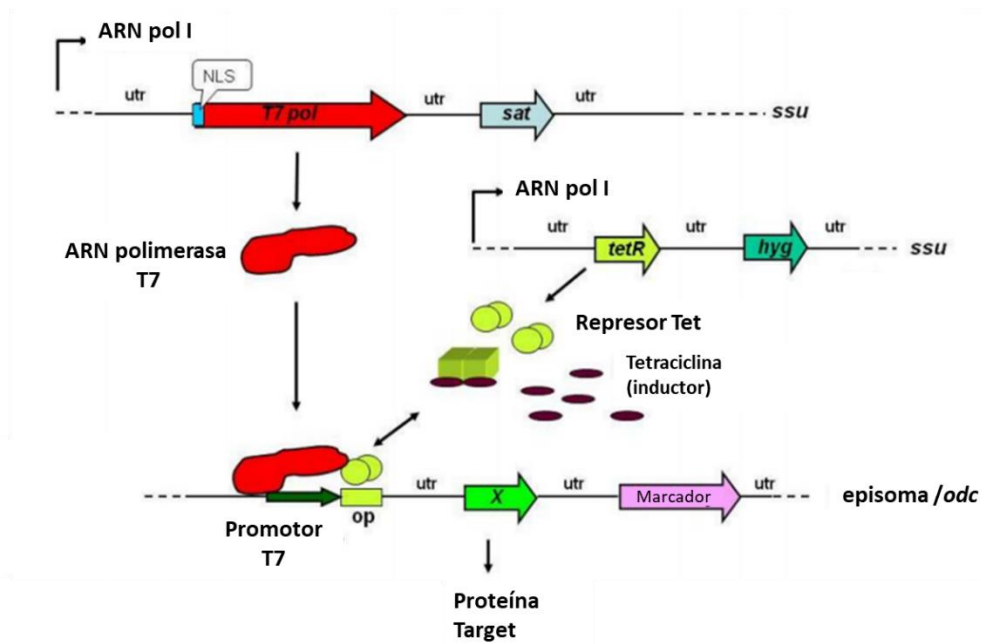


Figura 10. Arquitectura del sistema inducible. El huésped *L. tarentolae* T7-TR expresa la ARN polimerasa bacteriana T7 y el represor TET (TR). Luego de la transfección, el gen de interés (X) se expresa bajo el control del promotor T7 y el operador TET (op). El Marcador permite la selección con antibiótico de células que hayan integrado de manera estable las secuencias transgénicas en su genoma. Los *utr* son secuencias que flanquean genes y no se traducen para proporcionar las señales de empalme para el procesamiento postranscripcional del ARNm. *ssu* es el locus de integración a la secuencia de ARNr 18S cromosómica para los genes del represor de TET y de la ARN polimerasa T7. *Sat* e *hyg* son genes de resistencia a nourseotricina e higromocina respectivamente. NLS es la señal de localización nuclear. En ausencia de inductor (tetraciclina) la transcripción del gen de interés está inhibida debido a que la unión de la TR al op no permite la asociación de la ARN polimerasa T7 con el promotor T7. En presencia de tetraciclina, la TR no forma homodímeros funcionales y por lo tanto pierde afinidad por el op. Por lo tanto, la ARN polimerasa T7 se asocia con el promotor T7 y lleva adelante la transcripción del gen *target*. Editada de Jena Bioscience ⁸³.

La capacidad intrínseca de *Leishmania* para amplificar las moléculas de ADN circulares episomales ayuda a mantener el ADN exógeno durante muchas rondas de división celular. Esto ha permitido lograr una expresión relativamente duradera de genes codificados por moléculas de ADN episomal. En los sistemas episomales, los vectores circulares están diseñados de tal manera que la secuencia que codifica para proteínas está flanqueada por dos secuencias UTR, que albergan señales de trans-splicing y poliadenilación ⁵⁹.

En el sistema episomal, un alto número de copias de plásmidos por célula conduce a niveles de expresión más altos en comparación con el sistema integrativo. Para evitar la pérdida gradual de plásmido durante la división celular, en los vectores episomales se incluyen genes de resistencia a antibióticos y es necesario que los cultivos celulares se mantengan en medios de cultivo suplementados con dichos antibióticos. Esto hace que los sistemas integrativos, en los cuales se puede prescindir de marcadores de selección una vez seleccionado los clones estables, sean ventajosos, especialmente cuando la presencia del gen de resistencia a antibióticos es problemática o el antibiótico inhibe el crecimiento o la síntesis de proteínas ⁵⁹.

Las proteínas heterólogas expresadas en *L. tarentolae* pueden producirse intracelularmente o ser secretadas al medio. Debido a que *L. tarentolae* secreta niveles bajos de proteínas endógenas y que su medio de cultivo contiene pocas proteínas agregadas, una proteína heteróloga secretada comprende la gran mayoría de las proteínas totales en el medio. Por lo tanto, la secreción sirve como un primer paso importante de enriquecimiento del medio con la proteína de interés del resto de las proteínas celulares. La secreción requiere la presencia de una secuencia señal fusionada a la proteína de interés ^{73,74}. Algunas de las secuencias señales utilizadas son la derivada de la fosfatasa ácida secretada de *L. mexicana* (lmsap) o la de la estafiloquinasa del fago 42D de *Staphylococcus aureus*. No obstante, la secuencia señal nativa de la proteína a expresar ha sido reconocida por el sistema de procesamiento de proteínas de *L. tarentolae* y se ha utilizado con éxito para la secreción de EPO humana y la convertasa 4 de proproteína de rata ^{55,73}.

Para la expresión en el sistema de *L. tarentolae* el plásmido debe contener una señal para el trans-splicing del ARNm, seguido del gen de interés. Se puede obtener una mejor expresión si el gen de interés tiene a continuación el 3'-UTR de un gen de alta expresión. Dado que la regulación génica en *Leishmania* ocurre principalmente a nivel post-transcripcional a través de UTR intergénicos, la elección de UTR adecuados es importante para la construcción de un vector de expresión eficiente. Por ejemplo, los vectores pLEXSY de expresión constitutiva contienen tres UTR optimizados: utr1 derivado de la región intergénica de 0,4 kb del gen de la adenina fosforibosil transferasa de *L. tarentolae*; utr2 de la región intergénica de 1,4 kb del grupo de calmodulina de *L.*

tarentolae que contiene tres genes de calmodulina dispuestos en tándem (camCB); y utr3 de la región intergénica de 1,7 kb del gen de la dihidrofolato reductasa-timidilato sintasa de *L. major*, flanqueando los sitios de inserción del gen de interés y el marcador, que proporcionan la señal de trans-splicing para el procesamiento de ARNm postranscripcional⁵⁵.

L. tarentolae puede ser transfectada eficientemente por electroporación con los vectores de expresión recombinantes y la selección de transfectantes se realiza por adición del antibiótico de selección. Actualmente, cuatro marcadores de selección están disponibles en este sistema: neomicina fosfotransferasa (neo), higromicina fosfotransferasa (hig), proteína de resistencia a bleomicina (ble) y estreptotricina acetiltransferasa (sat) que confieren resistencia a G418, higromicina, bleomicina y nourseotricina, respectivamente. La obtención de cultivos transgénicos se puede hacer de forma policlonal (crecimiento en suspensión en medio líquido) o clonal (sembrado de las células en medios de selección sólidos), empleando los correspondientes antibióticos de selección^{55,73}.

Los niveles de expresión de proteínas heterólogas en *Leishmania* pueden variar según la proteína, el modo de expresión (integrativo o episomal), el locus y/o las secuencias reguladoras intergénicas, el número de copias del gen (para la forma integrativa) y el número de copias del plásmido (para la forma episomal). Con el objetivo de obtener mayores niveles de expresión es posible realizar transfecciones secuenciales, seleccionando un clon o un *pool* y volviendo a transformar y seleccionar con antibiótico, incrementando la dosis de antibiótico. Mediante este procedimiento se busca seleccionar aquel clon que tenga más resistencia y por tanto más copias del plásmido. En el caso de los vectores integrativos es posible realizarlo en aquellos que tengan varios sitios de integración posibles^{55,59}.

En el sistema de *L. tarentolae* se ha producido una gran cantidad de proteínas con altos rendimientos y de forma activa (Tabla 3).

Tabla 3. Lista de proteínas producidas utilizando el sistema de expresión de *L. tarentolae*

Proteína	Producción	Referencia
Cu/Zn superóxido dismutasa humana (SOD1)	intracelular	Gazdag <i>et al.</i> ⁸⁴
Activador del plasminógeno humano (PA)	secretada	Hemayatkar <i>et al.</i> ⁸⁵
Factor VII de coagulación humano	intracelular	Mirzaahmadi <i>et al.</i> ⁸⁶
Interferón-gamma humano (rhIFN- γ)	secretada	Davoudi <i>et al.</i> ⁸⁷
Fragmentos variables de simple cadena (scFv)	secretada	Klatt and Konthur <i>et al.</i> ⁸⁸
IL-29 humana	secretada	Taromchi <i>et al.</i> ⁸⁹
Region FC de IgG de conejo	secretada	Jorgensen <i>et al.</i> ⁹⁰
Fragmentos CD40	secretada	Mlynarcik <i>et al.</i> ⁹¹
Amelogenina humana (rhAm)	intracelular	Yadegari <i>et al.</i> ⁹²
Proteína 10 inductora de interferón γ (IP-10)	secretada	Taslimi <i>et al.</i> ⁹³
Eritropoyetina humana (hEPO)	secretada	Breitling <i>et al.</i> ⁷¹
Proproteína convertasa 4 de rata	secretada	Basak <i>et al.</i> ⁹⁴
Laminina-332 humana	secretada	Phan <i>et al.</i> ⁹⁵
N-Acetilserotonina O-metiltransferasa humana (ASMT)	intracelular	Ben-Abdallah <i>et al.</i> ⁹⁶
Proteína precursora amiloidea alpha soluble humana (sAPPalpha)	secretada	Klatt <i>et al.</i> ⁷⁷

2 Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis

La producción y el consumo de productos de origen animal han experimentado un rápido crecimiento en todo el mundo y se prevé que continuarán aumentando ⁹⁷. Para que el sector pueda satisfacer la creciente demanda de productos ganaderos de calidad y al mismo tiempo reducir al mínimo sus repercusiones en el medio ambiente y en los recursos naturales mundiales es fundamental incrementar la productividad. Es así que el uso de soluciones biotecnológicas constituye un aporte fundamental al sector.

Bajo la hipótesis de que *L.tarentolae* es capaz de expresar proteínas bioactivas, con muy buen rendimiento y a costos inferiores en comparación con la utilización de células de mamífero, proponemos que es posible producir la FSH bovina de forma recombinante (bFSH) de manera de obtener un producto libre de agentes adventicios, con un alto grado de pureza, una actividad biológica altamente específica, una disponibilidad potencialmente ilimitada y una homogeneidad lote a lote de la que no disponen los preparados actuales.

2.2 Objetivo general

Expresar, purificar y evaluar la actividad biológica de la bFSH quimérica que contiene ambas subunidades de bFSH en una única cadena polipeptídica utilizando a *L. tarentolae* como sistema de expresión.

2.3 Objetivos específicos

- Diseñar vectores de expresión para *L. tarentolae*.
- Obtener clones estables productores de bFSH.
- Optimizar las condiciones de expresión de bFSH.
- Escalar la producción a biorreactor de laboratorio.
- Identificar y optimizar el proceso de purificación de la hormona recombinante para obtener alto rendimiento y elevada pureza.
- Caracterizar bioquímicamente la proteína recombinante.
- Evaluar la calidad de la bFSH recombinante producida y purificada.

3 Metodología

3.1 Materiales

Todos los reactivos químicos utilizados fueron adquiridos en Sigma-Aldrich o AppliChem. Las enzimas utilizadas en los procedimientos de biología molecular fueron adquiridas en New England Biolabs (NEB) o Invitrogen. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies (IDT). Los kits para extracción y purificación de ADN fueron de Sigma-Aldrich o QIAGEN.

3.2 Métodos

3.2.1 Diseño y generación de los plásmidos para expresión de bFSH.

Se trabajó con un gen quimérico que contiene ambas subunidades de la bFSH en una única cadena polipeptídica. Se utilizaron dos construcciones diferentes: la bFSH_HisTag y la bFSH_2XStrepTag. La bFSH_HisTag contiene el péptido señal de secreción seguido de 6 histidinas y las subunidades β y α de la bFSH ligadas por el CTP como *linker*, mientras que la bFSH_2XStrepTag contiene el péptido señal de secreción seguido del 2X StrepTag, un sitio de corte para la proteasa TEV y las subunidades β y α de la bFSH ligadas por el CTP como linker. El 2X StrepTag consiste en dos péptidos sintéticos de 8 aminoácidos (Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys) separados por un linker de glicinas y serinas. Las secuencias codificantes y de aminoácidos se detallan en el Anexo 1.

La síntesis del gen quimérico con codones optimizados para *L. tarentolae* y su clonado en el vector de expresión para *L.tarentolae* inducible (pLEXY_IE-blecherry4, Jena Bioscience) se solicitaron a Genescript® (**Figura 11**).

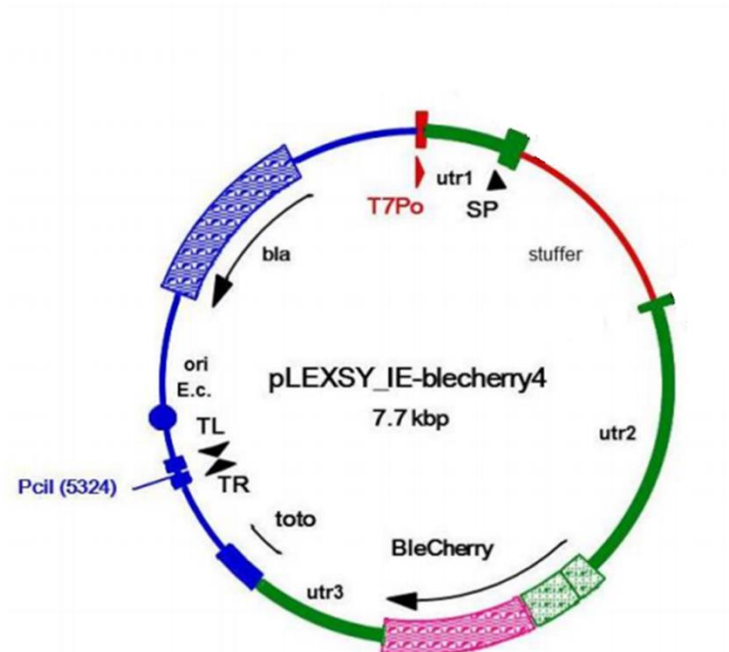


Figura 11. Vector de expresión inducible para *L. tarentolae*. utr1, utr2 y utr3 proporcionan las señales de empalme para el procesamiento post-transcripcional del ARNm. SP: péptido señal de secreción. TL y TR son los extremos teloméricos para la replicación episomal tras la linealización del plásmido de expresión con *PciI*. T7Po es el promotor de la ARN polimerasa T7, toto es la región terminadora de la transcripción. El gen blecherry confiere resistencia para selección de clones recombinantes con el antibiótico bleomicina y permite el *screening* de clones productores mediante la detección de la proteína fluorescente Cherry. Bla: gen de la β -Lactamasa que confiere resistencia a Ampicillina en *Escherichia coli* (*E.c.*). Ori: origen de replicación procariota.

Subclonado de bFSH HisTag en vector de expresión constitutivo para *L. tarentolae*

Se realizó el subclonado de la bFSH_HisTag en un vector constitutivo e integrativo (pLEXSY-Hyg2, Jena Bioscience). La secuencia fue aislada del plásmido pLEXSY_IE-blecherry4 que contiene la bFSH_HisTag.

El plásmido receptor pLEXSY_Hyg2 y el plásmido pLEXSY_IE-blecherry4 que contiene la bFSH_HisTag fueron digeridos con las enzimas *NotI* HF (NEB) y la *BglII* Fast dig (Thermo) y analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en buffer TAE 1X (40 mM Tris base pH 8,0, 40 mM ácido acético y 1 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)) y bromuro de etidio 0,5 μ g/mL. Los fragmentos fueron purificados a partir del gel mediante un kit comercial *PureLink Quickgel extraction* (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

La ligación de los fragmentos purificados se realizó con T4 DNA Ligasa (Invitrogen) según las indicaciones del proveedor incubando a 4°C durante toda la noche (ON, del inglés *over night*). Posteriormente, se transformaron *Escherichia coli* cepa Top10 quimiocompetentes con la reacción de ligación. Para ello, 100 µL de las células fueron incubadas con 10 µL de ADN por 30 min en un baño de hielo y luego se realizó un shock térmico a 42°C durante 90 segundos, seguido de 2 min en hielo, luego de lo cual se agregó 700 µL de medio SOC (triptona 20 g/L, extracto de levadura 5 g/L, glucosa 3,6 g/L, KCl 0,186 g/L, NaCl 0,5 g/L, MgCl₂ 0,96 g/L) y se incubó 1 hora a 37°C con agitación a 220 revoluciones por minuto (RPM). Cumplido este tiempo, una fracción de las células transformadas se sembró en placas de LB-agar (5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de triptona, 10 g/L de NaCl y 15 g/L de agar) suplementadas con ampicilina 100 µg/mL y se incubaron durante 16-20 h a 37°C.

El cribado inicial para detectar colonias positivas se realizó por la técnica de PCR de colonia utilizando cebadores diseñados para amplificar la bFSH (Fo_bFSH_Ltarentolae y Re_bFSH_Ltarentolae, descritos en la **Tabla 4**. Para ello, se tocó una colonia con un *tip* y fue resuspendida en la mezcla de PCR la cual consistió en:

- Taq ADN Polimerasa (2 U)
- Buffer 1X (1, 5 mM mM de MgCl₂)
- dNTP (0,2 mM de cada uno)
- Primer Fo (0,2 mM)
- Primer Re (0,2mM)
- H₂O destilada csp 25 µL

El programa de PCR fue el siguiente:

- Desnaturalización inicial 10 minutos a 94°C
- 30 ciclos de tres pasos:
 - a) Desnaturalización: 30 segundos a 94°C
 - b) Hibridación: 30 segundos a 54°C
 - c) Extensión: 30 segundos a 72°C
- Al finalizar los ciclos se realizó una extensión final incubando 5 minutos a 72°C.

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 1%p/v en buffer TAE 1X y bromuro de etidio 0,5 µg/mL. Se seleccionaron aquellas colonias positivas, las que presentaron un amplicón de 807 pb, para extraer el ADN plasmídico con el kit *QIAprep Miniprep* (QIAGEN). Finalmente, se verificó la integridad de la

secuencia del plásmido seleccionado mediante secuenciación utilizando los oligonucleótidos Fo_bFSH_Ltarentolae y Re_bFSH_Ltarentolae (servicio de secuenciación del Institut Pasteur de Montevideo).

Tabla 4. Lista de cebadores utilizados para las PCR realizadas en la generación de las construcciones

Nombre	Secuencia (5´-3´)
Fo_bFSH_Ltarentolae	AGATCTGCCATGACCAGCCGC
Re_bFSH_Ltarentolae	CCAGGTCGTGTTGATGCTGATG

En la Tabla 5 se resumen las construcciones disponibles para expresión inducible y constitutiva de bFSH en *L. tarentolae*

Tabla 5 . Construcciones para expresión de bFSH en *L. tarentolae*.

Nombre construcción	Secuencia expresada	Etiqueta de afinidad	Vector de expresión
bFSH_HisTag_pLEXSY_IE-blecherry4	bFSH	HisTag	pLEXSY_IE-blecherry4 (inducible)
bFSH_HisTag_pLEXSY_Hyg2		HisTag	pLEXSY_Hyg2 (constitutivo)
bFSH_2X StrepTag_pLEXSY_IE-blecherry4		2X StrepTag	pLEXSY_IE-blecherry4 (inducible)

3.2.2 Obtención de clones estables de *L. tarentolae* productores de bFSH

Cultivo de *L. tarentolae*

En este trabajo se utilizó la cepa *L. tarentolae* T7-TR (Jena Bioscience) que expresa constitutivamente la ARN polimerasa T7, la proteína represora del operador TET y una línea de *L. tarentolae* cepa salvaje (LOC) para expresión constitutiva.

Se generaron bancos celulares maestro y de trabajo para las dos líneas de *L. tarentolae*, a los cuales se le realizaron los controles de calidad para su posterior utilización, los mismos incluyeron: i) ausencia de microorganismos contaminantes (hongos y bacterias evaluado por técnicas microbiológicas, *Mycoplasma sp* realizado por técnicas moleculares) y ii) recuperación luego del descongelado con porcentajes de viabilidad superiores al 80%.

Los cultivos de *L. tarentolae* T7-TR se realizaron en medio BHI (del inglés infusión cerebro-corazón) 37 g/L suplementado con Hemina 5 µg/mL, penicilina 50 U/mL,

estreptomycin 50 µg/L, higromicina 100 µg/mL y nourseotricina 100 µg/mL. Para las líneas transfectantes además se adicionaron 100 µg/mL de bleomicina. Todos los cultivos fueron incubados en forma estática a 26°C en estufa.

Los cultivos de *L. tarentolae* LOC se realizaron en medio BHI (37 g/L) suplementado con Hemina 5 µg/mL, penicilina 50 U/mL y estreptomycin 50 µg/L. Para las líneas transfectantes se adicionaron 100 µg/mL de higromicina. Las incubaciones se realizaron en forma estática a 26°C en estufa.

Los recuentos se efectuaron en cámara de Neubauer (Precicolor HBG) diluyendo los cultivos en amortiguador fosfato salino (PBS: NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 8,1 mM y KH₂PO₄ 1,76 mM, pH 7,4) con glucosa al 1% (p/v) (PBS-G) inmediatamente antes de su conteo. Se consideraron como células viables aquellas que tenían movilidad y eran morfológicamente normales. Se determinó la correlación entre la concentración celular determinada por recuento en cámara con la densidad óptica a 600 nm a diferentes tiempos de cultivo.

La generación de los stocks celulares se realizó a partir de cultivos en fase de crecimiento exponencial (6-8 x10⁷ parásitos/mL) empleando glicerol 20% v/v. Los criotubos conteniendo los parásitos en glicerol fueron incubados 10 minutos a temperatura ambiente, 10 minutos en contenedor con isopropanol (Nalgene) a 4°C y O.N a -80°C. El almacenamiento a largo plazo se realizó a -80°C.

Transfección y selección de clones estables

Para realizar la transfección de *L. tarentolae* se cosecharon 30 x 10⁶ células en fase de crecimiento exponencial media (2-3 x 10⁷ células/mL) y se centrifugaron a 2000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron una vez con Cytomix (EGTA 2 mM pH 7,6; KCl 120 mM; CaCl₂ 0,15 mM; K₂HPO₄/KH₂PO₄ 10 mM; HEPES 25 mM pH 7,6; MgCl₂ 5 mM; Glucosa 0,5%; BSA 100 µg/mL; hipoxantina 1 mM) y luego se resuspendieron con 100 µL de solución *Amara Basic Parasite nucleofector* (Lonza).

Se agregaron 10 µg de la construcción de ADN correspondiente en un volumen máximo de 50 µL de H₂O. Según el caso para la transfección se empleó plásmido circular o plásmido previamente linealizado con 60 U de *PciI* (Thermo), O.N a 37°C para plásmido pLEXSY_IE-blecherry4 o 60 U de *SwaI* (NEB) O.N a 25°C para plásmido pLEXSY_Hyg2. La

precipitación del ADN digerido se realizó con acetato de sodio (concentración final 0,3 M) más 0,7 volúmenes de isopropanol, luego un lavado con alcohol 70% y finalmente se resuspendió en agua estéril.

En las cubetas de electroporación (Lonza) de 2 mm se colocó la mezcla ADN/células y se aplicó el programa de electroporación U-033 del equipo Amaxa Nucleofector 2b (Lonza). A continuación, los parásitos transfectados se transfirieron a 5 mL de medio de cultivo BHI completo conteniendo los antibióticos correspondientes para cada cepa y se incubaron O.N a 26°C.

Para realizar la selección clonal, los parásitos transfectados luego de cultivarlos O.N se cosecharon centrifugando a 2000 g durante 3 minutos y se resuspendieron en 0,6 mL de medio. Se esparcieron las células en placas frescas preparadas el mismo día con BHI agar suplementado con los antibióticos de selección, además de los requeridos por la cepa (BHI 37 g/L, suero fetal bovino inactivado 20 min a 56°C 10% v/v, Agar 10 g/L, HEPES 20 mM pH 7.4, Hemina 5 µg/mL, penicilina 50 U/mL, estreptomicina 50 µg/L y según corresponda higromicina 100 µg/mL, bleomicina 100 µg/mL y nourseotricina 100 µg/mL) a las que se le colocaron membranas de nitrocelulosa sobre la superficie. Se incubaron las placas a 26°C durante 5-7 días hasta la aparición de colonias pequeñas definidas.

En el caso de la cepa T7-TR, las membranas de nitrocelulosa con las colonias se transfirieron a placas frescas con BHI agar más el inductor Tetraciclina (10 µg/mL). Las células se incubaron a 26°C durante 2 días.

Los clones con mayor expresión de la proteína reportera fueron seleccionados visualmente evaluando la intensidad de la coloración rosada correspondiente a la proteína Cherry. Las células provenientes de las colonias fueron transferidas a 1 mL de BHI suplementado (placa de 24 pozos) mediante un *tip* y la placa se incubó durante 24 horas a 26°C.

Para el análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia correspondiente a cada clon se dispensaron alícuotas de 1 mL de BHI suplementado o no con tetraciclina 10µg/mL en una placa de 24 pozos y se inoculó cada pozo con 0,1 mL del cultivo crecido durante 24 horas. Se realizó el cultivo estático a 26-°C durante 2-3 días y se midió la intensidad de fluorescencia de la proteína reportera Cherry a 590 nm excitación/610 nm

emisión utilizando espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse (Agilent). Los clones con mayor intensidad de fluorescencia se seleccionaron y se evaluaron los sobrenadantes de los mismos mediante ELISA específico para FSH (Abnova). Aquellos que presentaron mayor producción se conservaron a -80°C con glicerol 20% v/v.

En el caso de la cepa LOC se seleccionaron colonias y se transfirieron a placa de 24 pozos conteniendo 1 mL de BHI suplementado y se incubó durante 24 horas a 26°C. Los sobrenadantes provenientes de los clones se analizaron mediante ELISA para cuantificar la presencia de FSH y aquellos que presentaron mayor producción fueron conservados a -80°C en presencia de glicerol 20% v/v.

3.2.3 Expresión y purificación de bFSH

Para la preparación de los inóculos empleados en los procesos de producción de FSH, células de *L. tarentolae* fueron descongeladas a partir de un vial del banco de trabajo y se cultivaron en 10 mL de medio BHI suplementado, a 26°C durante 48-72 horas o hasta que el cultivo alcanzó cierta turbidez (aproximadamente $6-8 \times 10^7$ células/mL). El estado y número de células fue monitoreado mediante observación al microscopio.

Producción a escala de matraz

A partir de un cultivo estático con una densidad celular entre 4 a 8×10^7 células/mL con células en fase exponencial de crecimiento, se realizó una dilución al quinto en BHI suplementado en matraz (respetando que el volumen de medio no supere $1/5$ del volumen del matraz). Este cultivo se incubó a 26°C y a 90 RPM en agitador orbital durante 24 horas. Pasadas las 24 horas el cultivo se diluyó al quinto en medio BHI fresco suplementado y se agregó tetraciclina $10 \mu\text{g/mL}$. El matraz se incubó nuevamente a 26°C y 90 RPM durante 48-72 horas según el caso.

Producción a escala de biorreactor

Se utilizaron 700 mL de cultivo crecido en agitación a una densidad de 4 a 8×10^7 células/mL como inóculo inicial del biorreactor (Benchtop BIOSTAT® B plus, Sartorius) el cual contenía 3,5 L de BHI suplementado. Luego de 24 horas de crecimiento se realizó el agregado de tetraciclina $10 \mu\text{g/mL}$. Dentro de los parámetros a optimizar se consideró la aireación (vvm), agitación (RPM), pH, generación de espuma, agregado de medio de cultivo concentrado, glucosa y hemina. El tiempo de cultivo luego de la inducción fue de

48-72 horas dependiendo el caso. Para la determinación del consumo de glucosa, se separó una fracción de medio de cultivo, se clarificó por centrifugación a 2000 g durante 10 minutos y se empleó el analizador automático Nova Biomedical BioProfile basic2 analyzer. El consumo de glucosa (uptake) se calculó utilizando la siguiente fórmula
$$\text{Uptake} = ([\text{Glc}_{t_0}] - [\text{Glc}_{t_1}]) / (t_1 - t_0)$$
, donde [Glc] es la concentración de glucosa y t el tiempo en el cual se realiza la medición de glucosa.

Clarificado y Concentración

Los cultivos inducidos se centrifugaron a 3000 g durante 20 minutos a 4°C, el sobrenadante recuperado de no ser utilizado inmediatamente se conservó a -20°C.

El sobrenadante clarificado fue filtrado a través de un filtro de 0,22 µm (Steritop, Millipore) y según correspondiera, concentrado mediante filtración tangencial utilizando el sistema Vivaflow® 50R, 10K MWCO Hy (Sartorius). Para ello, se utilizó una bomba peristáltica auxiliar (MasterFlex® L/S Easy-Load 3) que proporcionaba un flujo de entrada en el casete Vivaflow de 200 a 400 mL/minuto y una presión de salida de 2,5 bar, lo que permitió la recirculación de un volumen aproximado de cultivo filtrado de 1 L en un tiempo total de unas 3-4 h, hasta obtener un volumen final 100 mL.

Purificación de bFSH

Los sobrenadantes clarificados y/o concentrados se purificaron por métodos de cromatografía líquida. Para ello se contó con el equipo de cromatografía líquida de baja presión ÄKTA Pure® (General Electric Life Sciences, GE) con detección UV-visible en línea a 280 nm y diferentes columnas para purificación por cromatografía de afinidad, intercambio iónico y gel filtración.

Cromatografía de afinidad por metales inmovilizados

El sobrenadante fue cargado en una columna de cromatografía de afinidad por metales (IMAC, “immobilized-metal affinity chromatography”) (HisTrap® de 1 y 5 mL, GE Healthcare) previamente equilibrada en buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7,4 con NaCl 150 mM (amortiguador A), empleándose un flujo de 1-2 mL/minuto. Se colectó la fracción no unida de la siembra (FNU) y se lavó con 5 volúmenes de columna (CV) de amortiguador A conteniendo 5-40 mM de imidazol dependiendo el caso. La bFSH fue

eluída mediante el aumento de la concentración de imidazol en forma de gradiente o isocrático, según el caso. Para eliminar el contenido de imidazol, la fracción que contenía mayoritariamente a la proteína de interés según análisis por SDS-PAGE, fue dializada contra PBS 1X a 4°C con agitación utilizando una membrana con tamaño de poro de exclusión de 10 kDa (SnakeSkin™ 10K MWCO, Thermo Scientific).

Cromatografía de intercambio iónico

El sobrenadante sin concentrar o la bFSH purificada por IMAC se cargó en columna de intercambio catiónico (Resource™ S, GE Healthcare) de 1 mL. Para ello se equilibró la columna en acetato de sodio 8mM pH 4,5, NaCl 0,1M a un flujo de 1 mL/minuto. Previo a cargar la columna con el sobrenadante o la bFSH purificada por IMAC se le ajustó el pH a 4,5 con ácido acético. Se colectó la FNU y se lavó con 3 CV de acetato de sodio 8mM pH 4,5, NaCl 0,1 M. Posteriormente se lavó con 3 CV de buffer fosfato de sodio 0,1 M pH 5,5 y 3 CV de acetato de sodio 8mM pH 4,5, NaCl 0,16 M. Finalmente se eluyó con acetato de sodio 8mM pH 4,5, NaCl 0,8 M.

En algunos casos, como paso previo a la purificación por intercambio catiónico, el sobrenadante sin concentrar se enriqueció en FSH utilizando una columna de intercambio aniónico (Resource™ Q, GE Healthcare) de 6 mL. Para ello, se ajustó el pH del sobrenadante a 6,5 de manera que la bFSH se cargue positivamente y se lo sembró en la columna previamente equilibrada en Bis-Tris 20 mM pH 6,5. Se recolectó la FNU que contenía la bFSH y el resto de las proteínas se eluyeron con Bis-Tris 20 mM pH 6,5, NaCl 0,8 M.

Cromatografía de afinidad por StrepTag

Para este tipo de cromatografía, el sobrenadante sin concentrar fue incubado con bloqueador de biotina y posteriormente cargado en una columna StrepTrap™ HP (GE) de 1 mL equilibrada en PBS 1X a un flujo de 1 mL/minuto. Se colectó la FNU y se lavó con 5 CV de PBS 1X. Para la elución se utilizó PBS 1X con destiobiotina 2,5 mM o 10 mM dependiendo el caso.

Como alternativa se utilizó la columna Strep-Tactin XT (IBA Lifesciences) la cual está diseñada especialmente para ser utilizada con proteínas expresadas con 2X-StrepTag. El sobrenadante clarificado sin concentrar se cargó en la columna previamente equilibrada

con Tris/HCl 100 mM pH 8,0, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM (amortiguador W). Se colectó la FNU y se lavó con 5 CV de amortiguador W. Para la elución se utilizó el amortiguador BXT (amortiguador W + biotina 50 mM).

Cromatografía de exclusión molecular

Las fracciones purificadas se analizaron por cromatografía de exclusión molecular en columna analítica Superdex 75 10/300 GL (GE). Los ensayos fueron realizados sobre la columna equilibrada en PBS 1X pH 7,4 y empleando un flujo de 0,5 mL/minuto.

3.2.4 Herramientas informáticas

En este trabajo recurrimos habitualmente a información disponible en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para el análisis de secuencias de proteínas recurrimos a herramientas accesibles a través del sitio EXPASY (<http://www.expasy.org/proteomics>). Las imágenes de modelos estructurales presentadas en el trabajo se realizaron mediante el programa VMD (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>) a partir de archivos PDB depositado en el “Protein Data Bank” (<http://www.rcsb.org>). Las gráficas y tratamientos estadísticos fueron realizados usando el programa Origin (v.7 u 8, OriginLab, EUA) y el programa GraphPad Prism (v.5, GraphPad Software, EUA).

3.2.5 Procedimientos analíticos para la detección, identidad, calidad y conformación de la bFSH recombinante

Electroforesis en geles de poliacrilamida

La electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) se realizó en geles al 12 o 15% de acrilamida. Las muestras se trataron con amortiguador de carga (preparado a 6X Tris 62,5 mM pH 6,8; con 2 % (p/v) dodecilsulfato de sodio (SDS); 10 % (v/v) glicerol y 0,01 % (p/v) azul de bromofenol) con o sin el agregado de 50 mM de Ditioneitol (DTT) y se calentaron a 90-100°C durante 5 minutos previo a su siembra en el gel. Los geles se resolvieron a una corriente constante de 50 mA por gel. La tinción de los geles se realizó con Azul de Coomassie G-250 preparado al 0,12 % (p/v) en solución acuosa de H₃PO₄ al 10 % (p/v) y (NH₄)₂SO₄ 10 % (p/v), previo al uso se agrega etanol al 20% (v/v). Se utilizó H₂O destilada para desteñir. En aquellos casos donde se necesitó una tinción con mayor sensibilidad se empleó nitrato de plata, para ello se

realizó un lavado del gel con etanol (EtOH) 50% (v/v) - ácido acético 5% (v/v) durante 20 minutos, EtOH 50% (v/v) 10 minutos y H₂O 10 minutos. Luego se realizó la sensibilización con tiosulfato de sodio 0,02% (p/v) durante 30 segundos y se realizaron dos lavados de 1 minuto con H₂O. El tñido se realizó con AgNO₃ 0,1% (p/v) durante 20 minutos seguido por un lavado de 3 minutos con H₂O. Para el revelado se utilizó formaldehído 0,04% (v/v) - carbonato de sodio 2% (v/v) y se mantuvo en agitación hasta la visualización de bandas. Para detener la tinción se realizó un lavado durante 1 minuto con H₂O, 1 minuto con 5% ácido acético y se almacenó en ácido acético 1% (v/v) hasta su análisis o fotodocumentación.

Western blot

Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, GE) a una corriente constante de 450 mA durante 3 horas, en baño de hielo y empleando amortiguador de transferencia (Tris base 25 mM, glicina 192 mM, etanol 20% (v/v) pH 8,3). La membrana se bloqueó mediante incubación durante 1 hora en PBS conteniendo 5% p/v de leche en polvo descremada y 0,1% tween 20 (PBS-L-T) a temperatura ambiente y en agitación (60 RPM). Se realizaron 2 lavados de 5 minutos cada uno y con agitación a 80 RPM con PBS con 0,1% tween 20 (PBS-T). Luego se incubó la membrana de PVDF durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo primario policlonal de conejo anti-bFSH (4561-5279, Bio-Rad) diluido 1:1000 en PBS-L-T. A continuación se realizaron 2 lavados con PBS-T y la membrana se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a peroxidasa (31460, Invitrogen) diluido 1:40000 en PBS-L-T. Finalmente se realizaron 4 lavados con PBS-T de 5 minutos cada uno. La detección de la banda específica se realizó poniendo de manifiesto la actividad peroxidasa mediante quimioluminiscencia empleando el kit Amersham ECL reagents siguiendo las instrucciones del fabricante (GE Healthcare) y las láminas radiográficas Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare) se revelaron utilizando la máquina de revelado Hyperprocessor (Amersham Biosciences).

ELISA FSH

Las concentraciones de bFSH presente en los sobrenadantes de cultivo o proveniente de los diferentes pasos de purificación se cuantificaron mediante un kit de ELISA (del inglés

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) específico para FSH bovina (KA2278, Abnova). Se trata de un ELISA que utiliza un anticuerpo policlonal de ratón anti-bFSH inmovilizado en la placa de microtitulación y un anticuerpo anti-FSH acoplado a la peroxidasa de rábano (del inglés Horseradish peroxidase, HRP). Las determinaciones se efectuaron siguiendo las instrucciones del fabricante y realizando cada medida por duplicado. Brevemente, se incubaron los estándares y las muestras en la placa durante 2 horas a 37 °C. Luego de esta incubación, se procedió a lavar la placa una vez con buffer de lavado y se adicionó el anticuerpo conjugado a HRP y se volvió a incubar 1 hora a 37 °C. Pasado este tiempo se lavó la placa cinco veces con solución de lavado y se agregó la solución sustrato 3,3', 5,5'- tetrametilbenzidina (TMB). Se incubó durante 10-15 minutos en la oscuridad y luego se agregó HCl 2 N para detener la reacción enzimática. Finalmente, se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas Multiskan EX (Thermo Scientific, USA). Para la cuantificación de la hormona se realizó una curva estándar graficando los valores de absorbancia obtenidos para las diferentes concentraciones del estándar de referencia expresadas en ng FSH/mL. Posteriormente se estimó la concentración de cada muestra por extrapolación de la curva estándar.

Espectrometría de masa

La bFSH purificada fue analizada por espectrometría de masa (MS) en un espectrómetro Analyser 4800 MALDI TOF/TOF (Applied Biosystems), operado por personal de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica (UBYPa) del Institut Pasteur de Montevideo (IPM). La masa de las proteínas enteras se determinó usando como matriz una solución saturada de ácido sinapínico en 0,2 % ácido trifluoroacético (TFA) y 50 % acetonitrilo operando el equipo en modo lineal positivo con un rango m/z = 5000-40000. Las muestras fueron sembradas directamente en la placa, previamente desaladas usando microcolumnas de fase reversa con resina POROS 10R2 (Applied Biosystems). Para la determinación del perfil de péptidos tripticos en muestras proteicas se realizó la digestión de 20-50 µg de proteína con 0,15 µg de tripsina de calidad de secuenciación (Promega) en amortiguador bicarbonato de amonio 50 mM pH 8,4 durante 2 horas a 37°C. Se tomaron alícuotas de 1 µL de la muestra proteica y se mezclaron con el mismo volumen de una solución saturada de la matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA, Sigma-Aldrich) en 0,1% TFA y 50% acetonitrilo. Las mezclas se colocaron directamente

sobre la placa de muestra del espectrómetro de masa, se dejaron secar a temperatura ambiente y posteriormente se realizaron 1-3 lavados directamente sobre la placa con 0,1% TFA. En todos los casos, los espectros de masa de péptidos fueron adquiridos en modo reflector ($m/z = 500-5000$) usando CHCA como matriz y se calibraron de forma externa usando una mezcla comercial de péptidos de masa conocida (Applied Biosystems). Para la asignación de los péptidos y sus posibles modificaciones post traduccionales las masas medidas se compararon con masas teóricas de digestiones proteolíticas virtuales usando el programa MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) y las posibles modificaciones post traduccionales fueron evaluada consultando la base de datos "Delta Mass" de ABRF (<http://www.abrf.org/index.cfm/dm.home>).

Análisis de glicosilación

Para la liberación de los N-glicanos de la bFSH se empleó la endoglicosidasa PNGasa F (P0704S, NEB) que hidroliza el enlace entre el oligosacárido y la asparagina de la proteína glicosilada. La digestión se realizó tanto en solución como a partir de una banda obtenida a partir de un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Análisis mediante SDS-PAGE y Western blot

Se realizó la digestión en solución en condiciones desnaturalizantes siguiendo las instrucciones del fabricante, para ello se añadieron 500 U de enzima a 5-10 μ g de proteína purificada y se incubó O.N a 37 °C. Transcurrido dicho periodo se comprobó la eficiencia de la de-glicosilación mediante *Western blot* utilizando un anticuerpo anti-bFSH como se indica en el punto correspondiente a *Western blot*.

Análisis de sitios glicosilados y perfil de N-glicosilación

Se realizó la digestión con PNGasa F a partir de fragmentos de geles de poliacrilamida, para ello se prepararon las muestras de proteína y se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida como se indicó previamente. Una vez decolorado el gel se recortaron las bandas correspondientes a la proteína de interés y un fragmento de gel sin proteína para ser utilizado como blanco. Para cada fragmento de gel, se realizaron dos lavados con acetonitrilo 50% - NaHCO₃ 0,1 M a 30°C durante 30 minutos en agitación a 900 RPM. Luego se efectuó la reducción y alquilación de los fragmentos con DTT 55 mM durante 30 minutos a 30°C e Iodoacetamida (IAM) 275 mM por 60 minutos a

temperatura ambiente. Se lavaron las piezas del gel con H₂O a 30°C durante 5 minutos a 900 RPM, luego se lavaron con acetonitrilo a 30°C durante 15 minutos a 900 RPM y se dejaron secar dentro de flujo laminar. Las piezas de gel se incubaron a 37°C O.N. con 1000 U de PNGasa F en un volumen suficiente de solución tampón para que cubra el gel. Posteriormente se incubaron las muestras a temperatura ambiente en agitación a 900 RPM durante 10 minutos, se centrifugaron a 7000 g durante 5 minutos y se colectó el sobrenadante conteniendo los N-glicanos. Se adicionó H₂O de calidad milliQ al fragmento de gel y se incubó en un baño de ultrasonido durante 15 minutos, se centrifugó a 7000 g durante 1 minuto y se colectó nuevamente el sobrenadante. Se repitió dos veces y se juntaron todos los sobrenadantes que contienen los glicanos liberados. Las proteínas de-glicosiladas contenidas en el gel fueron sometidas a análisis por espectrometría de masa como se detalla en el punto correspondiente.

El análisis de los N-glicanos liberados por acción de la PNGasa F se realizó en colaboración con la Dra. Karina Mariño del Laboratorio de Glicómica Funcional y Molecular (IBYME) de Buenos Aires, Argentina. Para ello, se realizó la marcación fluorescente de los glicanos con 2-aminobenzamida (2-AB, Sigma). Los glicanos marcados fueron separados por cromatografía de interacción hidrofílica de ultra performance acoplado a detector de fluorescencia (HILIC-UPLC-FLR).

Los N-glicanos fueron separados utilizando la columna de interacción hidrofílica Acquity UPLC BEH Glycan 1,7 µm 2,1 x 150 mm (Waters) a 40°C. Como estándar externo se utilizó dextrano marcado con 2-AB y se transformó el tiempo de retención a unidades de glucosa (GU). El procedimiento consistió en la marcación fluorescente con 2-aminobenzamida (2-AB) de los glicanos liberados y la separación cromatográfica mediante HILIC-UPLC-FLR (**Figura 12**).

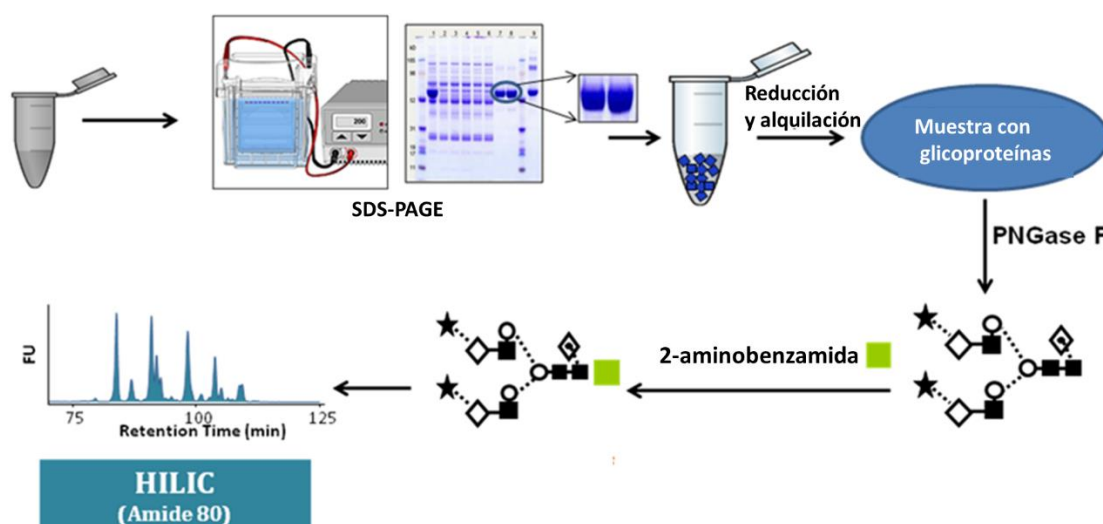


Figura 12 Esquema de trabajo para determinar el perfil de N-glicanos.

Análisis estructural por dicroísmo circular (CD)

El análisis de las muestras se llevó a cabo en el equipo de CD *Chirascan Q100 Spectropolarimeter* (Applied Photophysics, UK) instalado en el IPM. Las muestras fueron preparadas en un amortiguador NaHPO₄ 10 mM, pH 7,4; filtrado por filtros de 0,2 µm. Lectura de Región UV lejano, región amida: 180 - 250 nm

3.2.6 Ensayos de actividad biológica

Para evaluar la actividad biológica de la hormona se emplearon dos ensayos diferentes, uno *in vitro* basado en el empleo de una línea celular reportera y otro *in vivo*, el cual utiliza animales de laboratorio.

Actividad biológica *in vitro* de FSH

El sistema empleado para evaluar la actividad biológica *in vitro* de la hormona se basa en la capacidad de la FSH de estimular la generación de AMPc luego de interactuar con su receptor (FSH-R)⁹⁸⁻¹⁰⁰. Se utilizó una línea celular CHO-K1 (ATCC® CCL-61™) transfectada de forma estable con el receptor de la FSH humana desarrollada con anterioridad en el laboratorio (dicha línea se denomina CHO_pIRES2_AcGFP_hFSHR Clon 2E2). Dada la alta conservación de la secuencia de la FSH entre las especies de mamíferos^{101,102}, la bFSH es capaz de disparar la respuesta a través del receptor humano. Los niveles de AMPc se midieron mediante un test de ELISA competitivo (Cayman Chemical). En la **Figura 13.A** se representa la secuencia de pasos realizada en el ensayo *in vitro*.

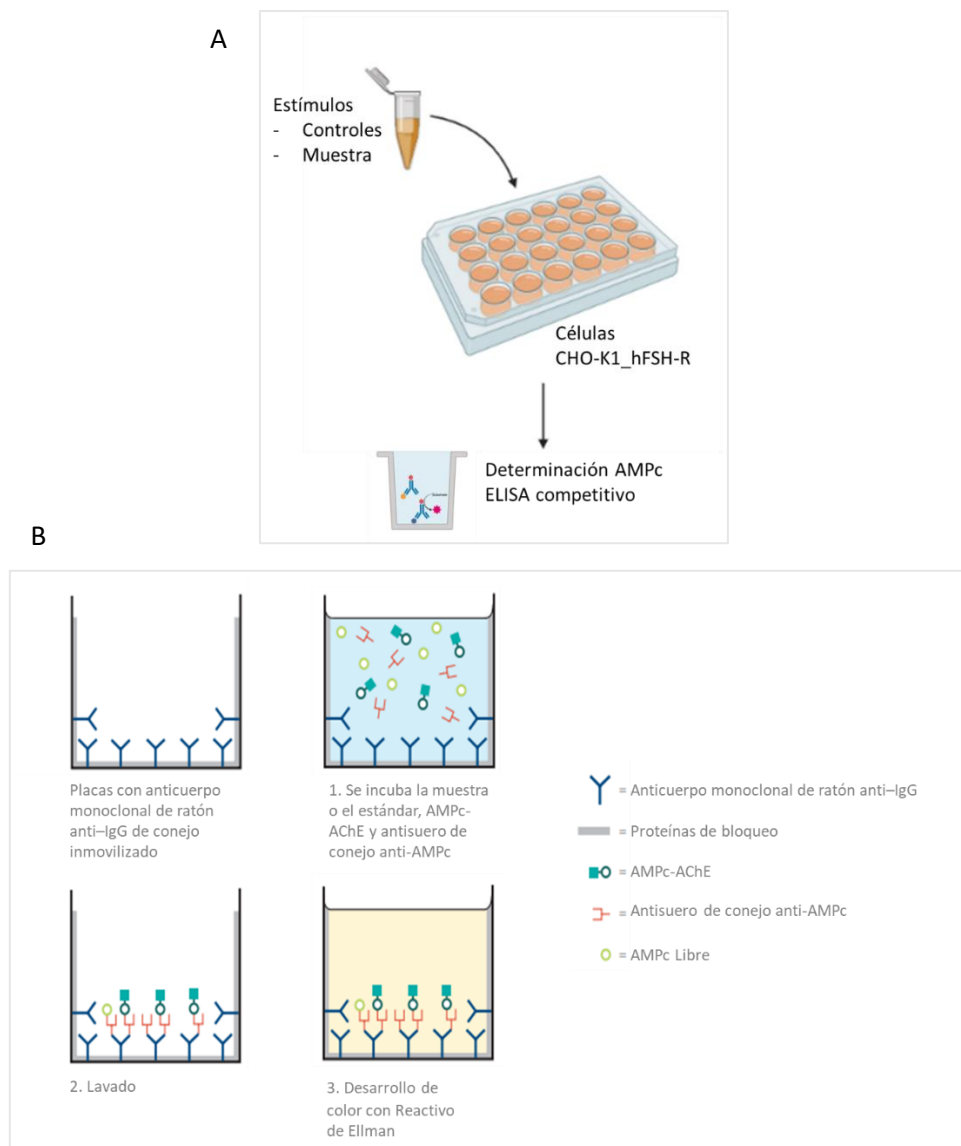


Figura 13. Secuencia de pasos del ensayo *in vitro* utilizado para determinar actividad de bFSH. A) Esquema de trabajo. Los controles y las muestras se estudian en diluciones seriadas al medio. **B)** Descripción del ELISA competitivo para la cuantificación de AMPc libre (presente en células lisadas tratadas con muestra o controles). Extraído de Cayman Chem¹⁰³

Las células fueron cultivadas en medio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB) y utilizando antibiótico de selección G418 (500 µg/mL) cada dos pasajes. Las células fueron sembradas en placa de 24 pocillos (2×10^5 células/pozo) y se incubaron a 37°C con 5% CO₂. Luego de 20 horas fueron lavadas con 500 µL de DMEM sin SFB y se agregó a cada pozo 250 µL de DMEM suplementado con 0,1 mM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) y se incubó a 37°C con 5% CO₂ durante 30 minutos. La adición de IBMX actúa como inhibidor de la fosfodiesterasa de AMPc,

permitiendo la acumulación de este último a nivel intracelular. Luego se realizaron diluciones seriadas al medio del estándar de FSH y de las muestras a evaluar en 250 μ l de DMEM suplementado con 0,1 mM de IBMX y se transfirieron a los pocillos correspondientes (todas las condiciones se ensayaron por duplicado). Los estándares de FSH utilizados fueron: extracto de glándulas pituitarias porcinas con actividad FSH (Folltropin, Vetoquinol), FSH porcina purificada por técnicas cromatográficas a partir de glándulas pituitarias (FSH Prospect, HOR-285), FSH humana recombinante producida en CHO (Puregon, Merck) y el standard internacional de FSH humana recombinante (FSH NIBSC 08/282). Las células fueron estimuladas durante 90 minutos a 37°C con 5% CO₂ y luego de un lavado con PBS fueron lisadas utilizando HCl 0,1 N. El kit utilizado para determinar los niveles de AMPc se trata de un ELISA competitivo, donde la competencia se da entre el AMPc libre presente en el lisado de células tratadas con el estándar o la muestra y el AMPc conjugado a acetilcolinesterasa (AChE). Previo a la cuantificación se acetilaron las muestras para aumentar el límite de sensibilidad siguiendo las indicaciones del fabricante. Se partió de una placa de microtitulación conteniendo un anticuerpo monoclonal de ratón anti-IgG de conejo inmovilizado en la cual se incubaron la muestra o el estándar, una cantidad constante del AMPc-AChE y un antisuero de conejo anti-AMPc durante 18 horas a 4°C. En ausencia de AMPc libre en la muestra, el anti-AMPc se une al AMPc-AChE formando un complejo, el cual se une al anticuerpo inmovilizado en la placa. En presencia de AMPc libre en la muestra, se produce la competencia con el AMPc-AChE por la unión al anti-AMPc (**Figura 13.B**). Por lo tanto, la absorbancia obtenida (correspondiente a AMPc-AChE detectado) es inversamente proporcional a la cantidad de AMPc presente en la muestra. Luego de lavar la placa cinco veces con solución de lavado, se adicionó el reactivo de Ellman que contiene el sustrato para la AChE y se incubó durante 90-120 minutos a temperatura ambiente, en agitación y oscuridad. Finalmente se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de placas Multiskan EX (Thermo Scientific, USA). La concentración de AMPc de la muestra se determina a partir de una curva standard elaborada con concentraciones conocidas. Se aplicó análisis de varianza de one-way ANOVA.

Actividad biológica *in vivo* de FSH

Los procedimientos que involucran el uso de animales de experimentación fueron realizados en el Laboratorio BIO FUCAL S.A. de Buenos Aires, Argentina, siguiendo los lineamientos en completa conformidad con la Disposición Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) N° 2819/2004.

Para evaluar la actividad biológica *in vivo* se realizó el ensayo propuesto por la Farmacopea Europea para el Follitropin (hFSH recombinante) (Ph.Eur 01/2015:2285). En el ensayo se emplearon ratas hembras sexualmente inmaduras de la cepa Sprague Dawley, cepa CrI:CD®(SD)IGS-BR de 19 a 28 días de edad y se evaluó el aumento del peso de los ovarios producto de la estimulación hormonal.

Para que el ensayo sea válido y permita estimar la potencia de la FSH se deben utilizar animales con no más de 3 días de diferencia en sus nacimientos y no más de 10 g de diferencia en el peso entre el más liviano y el más pesado. Las ratas se dividieron aleatoriamente en 6 grupos de 6 animales cada uno y se utilizaron 3 dosis de la preparación de referencia con actividad foliculoestimulante y 3 dosis de la preparación a examinar. Las dosis a utilizar deben elegirse de forma tal que la dosis menor sea capaz de producir respuesta positiva en algunas de las ratas mientras que la mayor dosis no produzca el máximo efecto en todos los animales. Las dosis deben tener una progresión geométrica indicándose como aproximación inicial por ejemplo 1,33 UI, 0,66 UI y 0,33 UI, aunque la dosis puede variar según la sensibilidad de los animales a utilizar. Además, todas las soluciones deben tener 14 UI de gonadotrofina coriónica humana (hCG) para asegurar la completa luteinización de los folículos. El procedimiento consistió en dar una inyección subcutánea de 500 µL de la formulación a cada grupo establecido y se repitió la inyección a las 24 y 48 horas luego de la primera inyección. A las 24 horas de la última inyección, los animales fueron sometidos a eutanasia y posterior remoción de ovarios. Es importante retirar el excedente de grasa y tejidos anexos. Se colocaron los dos ovarios en una bandeja previamente tarada y se pesaron en balanza analítica. A partir del peso de los ovarios se realizó la validación estadística determinando regresión ($p < 0,01$), linealidad ($p > 0,05$) y paralelismo ($p > 0,05$) y se determinó la potencia. Se aplicó análisis de varianza de ANOVA. En la **Figura 14** se muestra el esquema del ensayo utilizado.

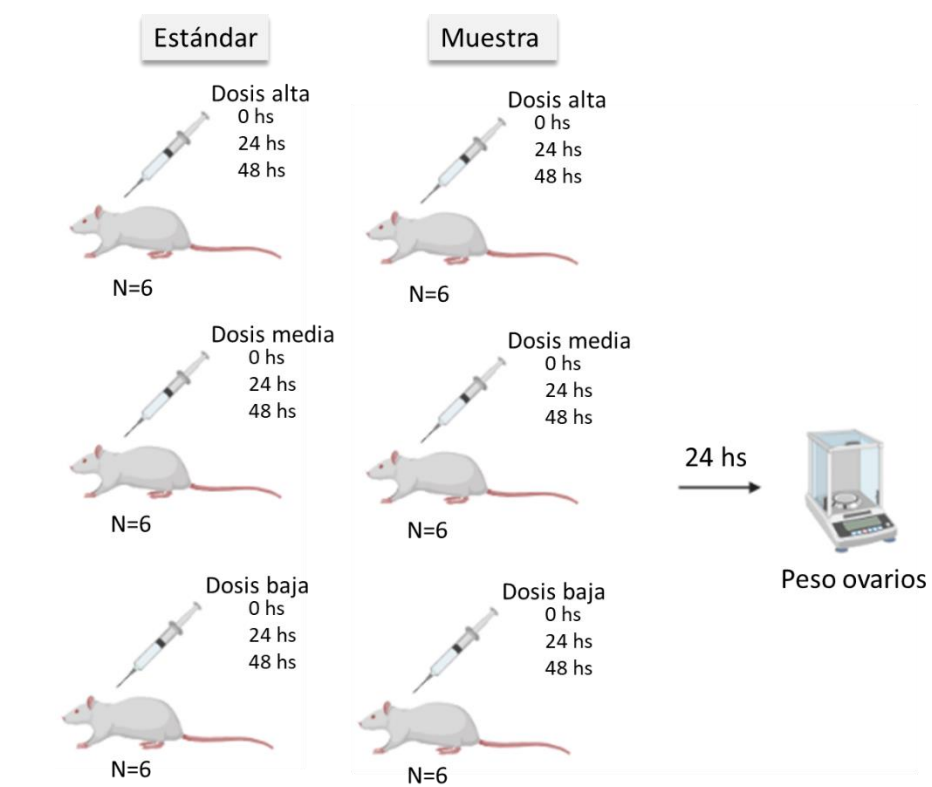


Figura 14: Esquema de ensayo utilizado para determinar actividad biológica *in vitro* de FSH.

4 Resultados y discusión

4.1 Diseño de vectores de expresión para *L. tarentolae*

Con el objetivo de generar vectores de expresión de la bFSH en *L. tarentolae* y buscando simplificar el proceso de producción y purificación se trabajó con un gen quimérico que contiene ambas subunidades de la bFSH en una única cadena polipeptídica. Se diseñó la construcción de manera tal que el péptido señal de secreción precediera a una secuencia etiqueta (*tag*) que facilita la purificación de las subunidades β y α de la bFSH ligadas por el CTP (**Figura 15**).



Figura 15. Esquema de la construcción clonada en los vectores de expresión. SP: péptido señal de secreción, 6x-His: etiqueta de 6 histidinas, β -bFSH: subunidad β de la bFSH, CTP: *linker* correspondiente al péptido carboxilo terminal de la hCG, y α -bFSH: subunidad α de la bFSH.

La síntesis del gen quimérico con codones optimizados para su expresión en *L. tarentolae* y su clonado en el vector de expresión pLEXY_IE-blecherry4, se solicitó a la empresa Genescript®. Este vector, que se propaga de forma estable en las células como episoma lineal, es bicistrónico e inducible. La expresión del gen de interés se encuentra bajo el control del promotor T7 por lo tanto la célula hospedera debe ser capaz de expresar la T7 RNA polimerasa y para sistemas inducibles el represor TR (cepa T7-TR). Simultáneamente, este vector permite la co-expresión de la proteína fluorescente Cherry como reportero, facilitando el monitoreo de la inducción y la selección de clones con alta producción ya que en general los niveles de expresión del reportero se correlacionan con los de la proteína de interés⁸³. Como péptido de secreción se empleó una variante distinta a la presente en el plásmido comercial para la cual se ha descrito mejores niveles de secreción⁸⁸. En el **Anexo 1** se detalla la secuencia.

4.2 Obtención de clones estables de *L. tarentolae* inducible bFSH His-Tag (*L. tarentolae* T7-TR bFSH HisTag pLEXY_IE-blecherry4)

Se realizó la transfección de *L. tarentolae* T7-TR con la construcción bFSH_HisTag_pLEXY_IE-blecherry4 previamente linealizada y sin linealizar. Se ensayaron estas dos conformaciones teniendo en cuenta experiencias previas de nuestro laboratorio donde

se observaron diferencias en los niveles de expresión obtenidos dependiendo de la conformación, cerrada o lineal, de la construcción utilizada en la transfección. La selección de clones se llevó a cabo en membranas de nitrocelulosa sobre placas con medio semisólido en presencia del antibiótico bleomicina. Una vez que se desarrollaron colonias resistentes al antibiótico, estas membranas se transfirieron a placas frescas con el inductor tetraciclina. Se seleccionaron aquellos clones que durante la inspección visual presentaron mayor intensidad de coloración rosado correspondiente a la proteína Cherry (**Figura 16.A**). Estos doce clones se subcultivaron en medio líquido por 48 horas en presencia y ausencia de tetraciclina y se procedió a cuantificar la intensidad de fluorescencia de la proteína Cherry empleando un fluorímetro. En la **Figura 16.B** se muestran los seis clones que presentaron la mayor señal de Cherry normalizada por la densidad óptica del cultivo, así como una imagen representativa de uno de los clones inducidos obtenida en un microscopio de epifluorescencia (**Figura 16.C**).

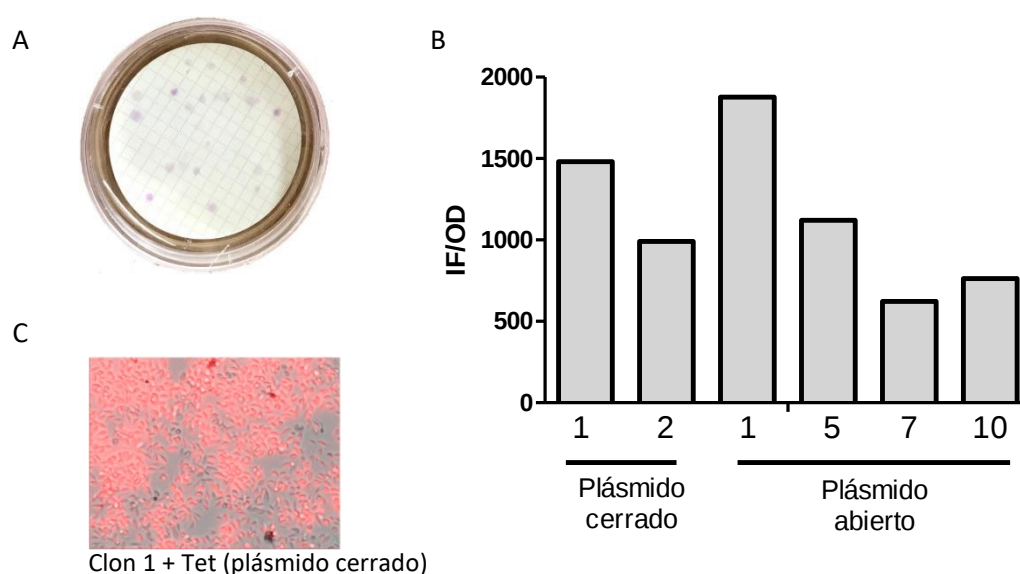


Figura 16. Screening y selección de clones estables de *L. tarentolae* T7-TR que expresan la bFSH de manera inducible. A) Placas con medio semisólido en presencia del antibiótico bleomicina y tetraciclina. **B)** Evaluación de Intensidad de Fluorescencia (IF) de la proteína reportera Cherry de clones resistentes a bleomicina en presencia del inductor tetraciclina. Los números refieren a los diferentes clones obtenidos a partir de transfecciones con el plásmido linealizado (abierto) y sin linealizar (cerrado), respectivamente. La IF (λ excitación = 590 nm y λ emisión = 610 nm) se normalizó contra el número de células estimado por densidad óptica a 600 nm (OD). **C)** Imagen de microscopio de epifluorescencia representativa de uno de los clones inducidos. (λ de excitación = 580-630 nm y λ de emisión = 645-695 nm).

Posteriormente, con el fin de comprobar la correlación entre el nivel de expresión de la proteína reportera y la producción de bFSH, se cuantificó mediante ELISA específico la secreción de bFSH en los sobrenadantes de cultivo de los tres clones que presentaban mayor intensidad de fluorescencia de Cherry: clon 1 (plásmido cerrado), clon 1 (plásmido abierto) y clon 5 (plásmido abierto). Las medidas fueron tomadas luego de 72 horas de inducción, realizándose duplicados biológicos. En la **Figura 17** se observa correlación directa entre la intensidad de fluorescencia de la proteína reportera y el contenido de bFSH. Este resultado nos permitió validar el empleo de la intensidad de fluorescencia de la proteína reportera Cherry como parámetro de selección de aquellos clones con elevados niveles de expresión de bFSH.

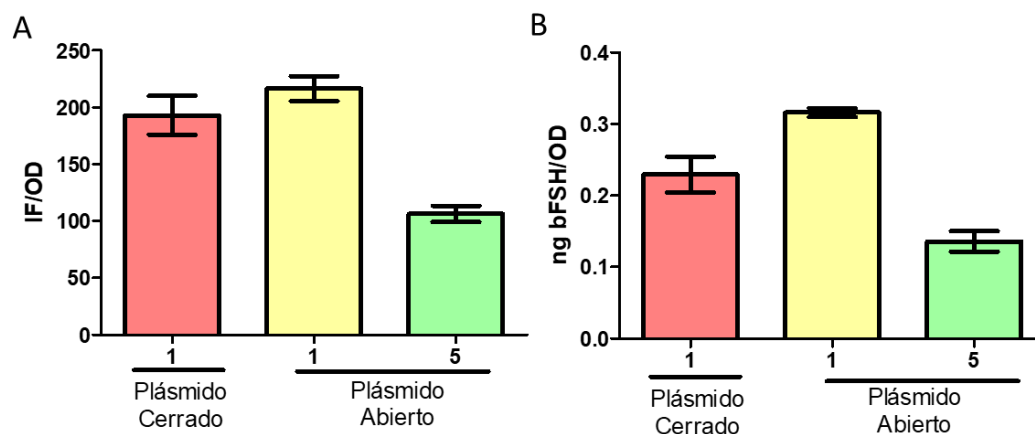


Figura 17. Análisis comparativo de la expresión de la proteína reportera Cherry y la bFSH. A) Evaluación de Intensidad de Fluorescencia (IF) de la proteína reportera Cherry en clones transfectados con bFSH_HisTag _pLEXSY_IE-blecherry4 en presencia del inductor tetraciclina. Los números indican los diferentes clones, obtenidos a partir de transfecciones con el plásmido cerrado y abierto. La IF (λ excitación = 590 nm y λ emisión = 610 nm) se normalizó contra el número de células estimado por densidad óptica a 600 nm (OD). **B)** Evaluación de la producción de bFSH utilizando ELISA específico. Los ng de bFSH se normalizaron contra el número de células estimado por densidad óptica a 600 nm (OD).

Considerando que no hubo diferencias considerables de expresión entre los clones generados a partir de plásmido cerrado o abierto y teniendo en cuenta que está reportado que la transfección con plásmido cerrado es más estable¹⁰⁴, se seleccionó el clon 1 transfectado con plásmido sin linealizar para su posterior uso.

4.3 Expresión de bFSH

4.3.1 Optimización de las condiciones de cultivo y evaluación de la cinética de inducción de *L. tarentolae* productora de bFSH a escala de laboratorio.

Con el objetivo de determinar el tiempo óptimo de inducción para obtener la máxima expresión de bFSH se estudió la cinética de inducción de la línea de *L. tarentolae* inducible bFSH His-Tag clon 1. Se trabajó a escala de laboratorio empleando matraces y un volumen de cultivo de 50 mL, crecido a 26°C con una agitación de 90 RPM e induciendo la expresión de bFSH con 10 µg/mL de tetraciclina, hasta que el cultivo alcanzó una densidad de $6-7 \times 10^7$ cel/mL.

Se tomaron muestras de sobrenadante a las 24, 48 y 72 horas post-inducción. No se evaluaron tiempos más extensos de inducción porque se evidenció un incremento significativo de lisis celular lo cual podría interferir en la posterior purificación y/o conducir a la degradación de la FSH. Sobre las muestras de sobrenadantes de cultivo se realizaron diferentes análisis que incluyeron la detección de bFSH mediante ELISA (**Figura 18.A**), fluorescencia de la proteína reportera (**Figura 18.B**) y *Western blot* utilizando como anticuerpo primario un anti-bFSH y un anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa HRP (**Figura 18.C**). La estimación por ELISA mostró que a las 72 horas post-inducción se alcanza el mayor nivel de expresión de la bFSH y el resultado de *Western blot*, además de coincidir con esta determinación, muestra que a este tiempo de inducción no habría degradación de la proteína. El peso molecular teórico de la bFSH teniendo en cuenta su secuencia aminoacídica es de 26 kDa y 29 kDa con el *tag*, en el *Western blot* esta proteína muestra un peso molecular aparente mayor, consistente con una proteína glicosilada.

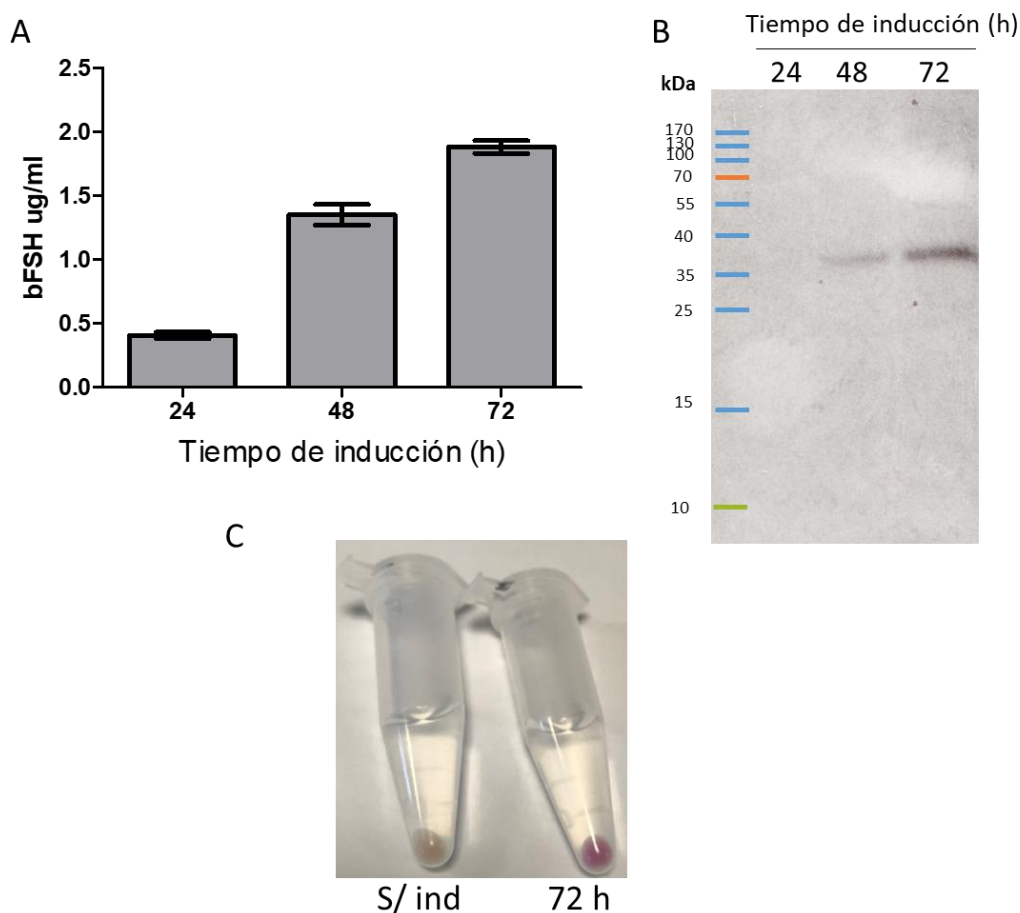


Figura 18. Evaluación de la cinética de expresión de bFSH luego de la inducción. Cultivos que alcanzaron una densidad de $6-7 \times 10^7$ cel/ml fueron inducidos con tetraciclina y se tomaron muestras de los sobrenadantes a las 24, 48 y 72 h. **A)** Determinación de la producción de bFSH en el sobrenadante de cultivo utilizando ELISA específico. **B)** *Western blot* con anticuerpo anti-bFSH. **C)** Comparación visual del *pellet* de un cultivo sin inducir (S/ind) e inducido durante 72 horas (72 h).

Se realizaron numerosos cultivos a escala de matraces, con resultados consistentes luego de 72 h de inducción, alcanzándose OD a 600 nm cercanas a 4 y un rendimiento promedio de producción de bFSH de 1,5 mg/L de cultivo.

Establecido que el tiempo óptimo de inducción es a las 72 h, se analizó si en estas condiciones la secreción de la bFSH al medio de cultivo era eficiente. Para ello se evaluó la cantidad de bFSH presente en el sobrenadante y en el interior celular en un volumen fijo de medio. Se centrifugaron 40 μ L de una suspensión celular y se centrifugó, el sobrenadante se cargó puro y diluído (1/2 y 1/4 en PBS 1X). El *pellet* celular de 1 mL de cultivo se lavó con PBS 1X, se lisó en 200 μ L de buffer de carga 6X cada 1×10^8 células

calentando a 100°C y se ajustó a 1X de buffer de carga utilizando PBS. Un volumen equivalente a las células presentes en 40 µL se cargó de forma pura y diluida (1/2 y 1/4). Tal como se puede observar en la **Figura 19** se detectó presencia de la bFSH únicamente en muestras de sobrenadante de cultivo y no así en aquellas correspondientes a los lisados celulares. Esto indica que la secreción de la proteína recombinante es altamente eficiente no detectándose retención significativa de la misma a nivel intracelular.

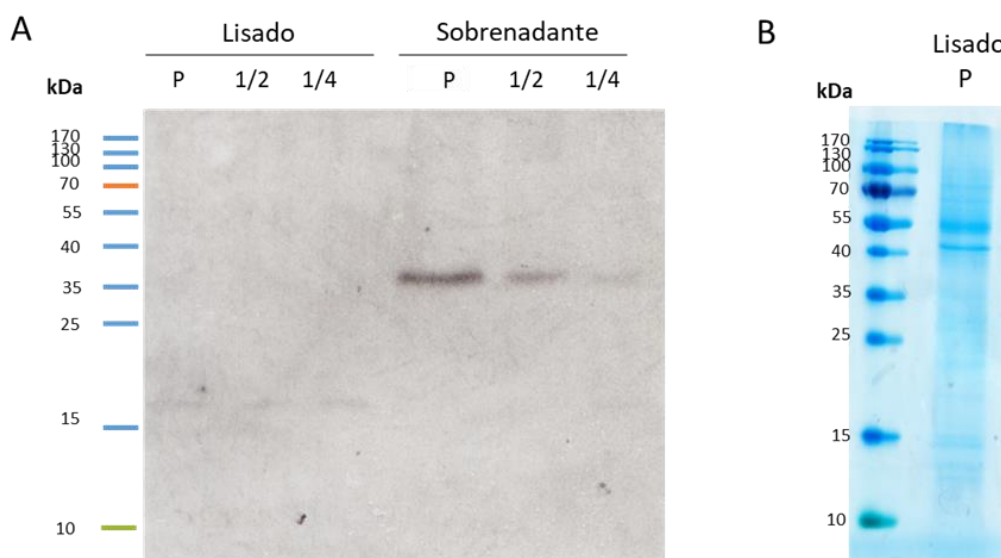


Figura 19. Evaluación de la eficiencia de secreción de bFSH. A) *Western blot* del sobrenadante y lisado celular luego de 72 h de inducción revelado mediante un anti-bFSH. P: puro, 1/2: diluido 1/2 en PBS 1X, 1/4: diluido 1/4 en PBS 1X. B) Control de lisado celular puro en un SDS-PAGE al 15% obtenido luego de 72 h de inducción. Tinción con *Coomassie blue*.

4.4 Escalado de la producción de bFSH en un biorreactor

Una vez caracterizado el tiempo óptimo de inducción para que se produzca la mayor expresión de bFSH por el clon de *L. tarentolae* seleccionado se procedió a escalar el cultivo de matraces a un biorreactor (**Figura 20.A**). Este sistema permite monitorear y controlar parámetros como la temperatura, saturación de oxígeno y pH, permitiendo alcanzar mayor densidad celular (biomasa) y por ende mayor producción de la proteína recombinante. Un aspecto crítico en los biorreactores es la formación de espuma, ya que puede reducir la productividad y rendimiento del proceso, provocar la pérdida de esterilidad, si la espuma comienza a salir del biorreactor, o causar un aumento de presión en aquellos casos que la misma bloquee un filtro de salida. El uso de

antiespumantes previene su formación, sin embargo los mismos pueden tener impacto en el crecimiento celular o en el producto de interés¹⁰⁵. Para la puesta a punto del cultivo en biorreactor se evaluó el uso de antiespumante a pequeña escala. Esta reportado que el uso de antiespumantes puede inhibir el crecimiento de *L. tarentoale*⁶⁹, por lo tanto, estos deben agregarse en cantidades reducidas y la dilución apropiada debe determinarse de forma empírica. Como primer aproximación se utilizó el Antifoam 204 (Sigma) el cual es una mezcla de antiespumantes orgánicos sin siliconas en una dispersión de poliol, la cual se utilizó al 0,0005% v/v y 0,001% v/v, concentraciones previamente reportadas en la bibliografía⁶⁹ y que son un orden de magnitud menor a las que aconseja el proveedor. A las 24 horas ambas concentraciones de Antifoam 204 inhibieron de manera marcada el crecimiento celular, determinado por OD600, por lo que se decidió descartar el uso de este antiespumante (**Figura 20.B**).

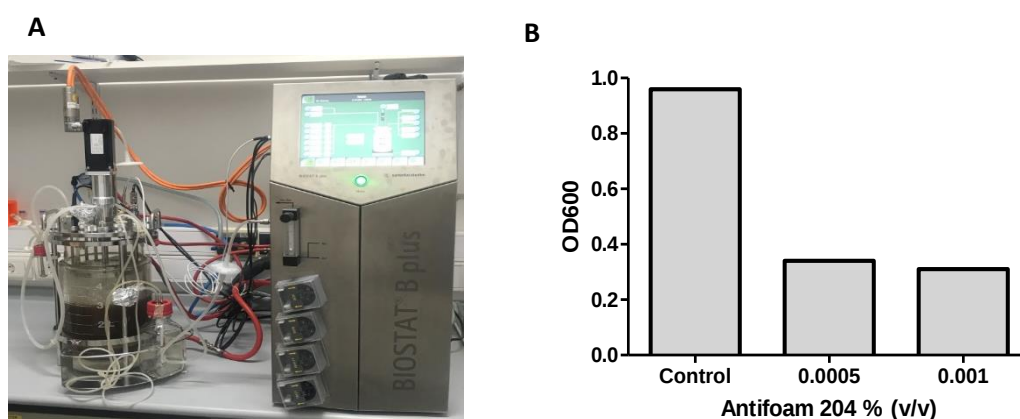


Figura 20. Imagen del Biorreactor y efecto del Antifoam 204 sobre el crecimiento de *L.taretonale*. A) Imagen del Benchtop BIOSTAT® B plus, Sartorius siendo utilizado. **B)** Se emplearon dos concentraciones de antiespumante (0.0005% v/v y 0.001% v/v) y el crecimiento celular se determinó por medición de la OD a 600nm a las 24 h. Como control se utilizó el cultivo sin el agregado de antiespumante.

Como alternativa se evaluó el Antifoam B (Sigma) el cual es una emulsión acuosa conteniendo 10% v/v de silicona activa. Se utilizó al 0,001% v/v, y se evaluó el efecto durante 24, 48 y 72 horas de cultivo a escala de matraz. Como se observa en la **Figura 21** el crecimiento de *L.tarentolae* en presencia de Antifoam B es similar al del control no tratado. Por lo tanto, se eligió esta formulación y concentración de antiespumante para los experimentos en biorreactor.

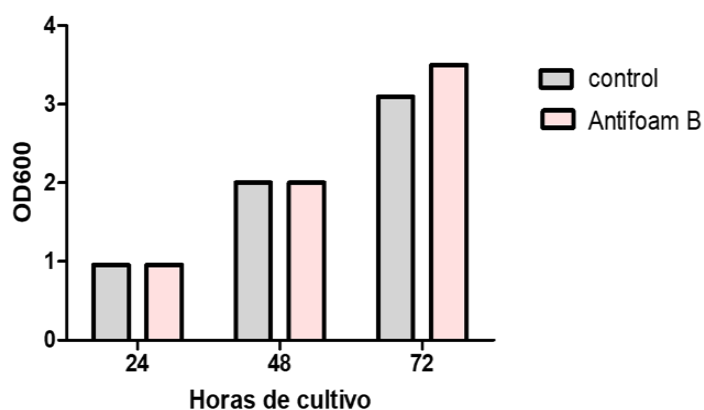


Figura 21. Evaluación del efecto de Antifoam B sobre el crecimiento de *L.tarentonae*. El antiespumante se empleó al 0.001% v/v y se evaluó su impacto sobre el crecimiento celular determinado por medida de la OD a 600 nm a diferentes tiempos (24, 48 y 72 h). Como control se evaluó un cultivo sin el agregado de antiespumante.

No existen demasiados reportes en los que se describa el cultivo de *L. tarentolae* en biorreactor y en la escasa bibliografía disponible se recomienda trabajar con una aireación de 1 volumen de aire por volumen de medio por minuto (vvm) y una presión de oxígeno disuelto (pO_2) del 20% ⁶⁹. En nuestro caso se estableció trabajar como máximo a 0,6 vvm debido a la generación de espuma que se produjo a vvm mayores, por lo tanto, se decidió aumentar el valor mínimo (*set point*) de pO_2 a 50% para que el contenido de este gas no fuese una limitante. En el caso de la agitación se estableció un rango de 90 a 100 RPM. El biorreactor trabaja en cascada para que el valor de pO_2 no sea menor al valor establecido (*set point*), una vez que detecta un valor por debajo del 50% inyecta O_2 a la mezcla de gases en forma de pulso. Se estableció un tiempo de histéresis, tiempo que tolera fuera del *set point*, de 30 segundos.

Durante el cultivo en biorreactor se monitoreó el crecimiento mediante la medida de densidad óptica a 600 nm (OD600) y recuento en cámara de Neubauer, la concentración de glucosa y de bFSH presente en el sobrenadante de cultivo. Está recomendado que la concentración de glucosa no descienda por debajo de 1 g/L, por lo que debió ser suplementada durante el cultivo. La hemina, suplemento nutricional esencial, fue adicionada cada vez que el crecimiento celular aumentaba 2,5 unidades de OD600. También se adicionó medio BHI 5X aproximadamente a la mitad del tiempo total que durara la corrida. En el primer lote de producción en biorreactor se realizó la inducción

de la expresión de la proteína recombinante a una OD600 de 1,5 y durante 72 horas. En la (Figura 22), se muestran los parámetros evaluados para este lote de producción. La captación de glucosa mostró un marcado aumento durante la fase logarítmica media (30-40 h) y alcanzó una meseta a partir de entonces. En estas condiciones de cultivo se obtuvo una OD600 máxima de 9,5 ($6,2 \times 10^8$ células/mL), el nivel de bFSH en el sobrenadante de cultivo evaluado por ELISA mostró un rendimiento de 3,6 $\mu\text{g/mL}$ de bFSH y mediante *Western blot* se comprobó la integridad de la proteína.

Esta cantidad de hormona recombinante es casi 2 veces superior a la obtenida en cultivos discontinuos realizados en matraces Erlenmeyer (3×10^8 células/mL y 1,9 (+/- 0,07) $\mu\text{g/mL}$ de rbFSH. Sin embargo, si bien se obtuvo un alto nivel de expresión de bFSH, tanto la presencia de detritos celulares como de precipitado de hemina dificultó el filtrado del sobrenadante y su posterior procesamiento, por lo que en las corridas posteriores se optó por limitar el cultivo en el biorreactor a 48 horas de inducción y no suplementar con hemina. En lo que refiere a esto último, se ha reportado que la hemina puede precipitar en el medio de cultivo, pudiendo afectar el procesamiento *downstream*

106

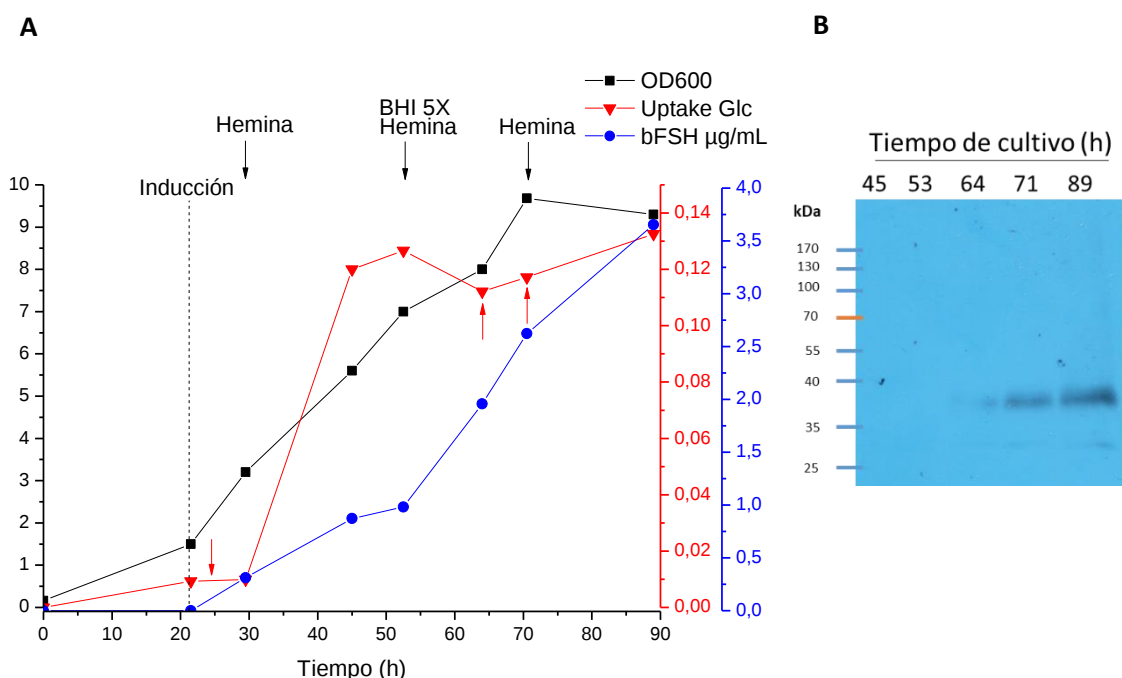


Figura 22. Primer lote de producción de bFSH en biorreactor. A) Monitoreo del crecimiento celular de *L. tarentolae* mediante la OD600, el consumo de glucosa (Uptake Glc en $\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$) y la producción de bFSH por ELISA. Las flechas indican el momento en que se suplementó con Hemina, BHI 5x y glucosa (flecha roja). **B)** Análisis de la producción de bFSH mediante *Western blot* y revelado con anti-bFSH.

Durante el segundo lote de producción se mantuvieron las condiciones generales del proceso, realizando la inducción a una OD600 cercana a 1,5 pero reduciendo el tiempo de cosecha post inducción a 48 horas y suplementando únicamente con glucosa. La cinética de crecimiento durante las primeras 24 h fueron muy similares entre el primer y segundo lote (**Figura 22.A y 23.A**). En concordancia con tener una menor disponibilidad de nutrientes, el segundo lote alcanzó la fase estacionaria 24 h antes y mostró una densidad celular comparativamente menor ($OD_{600} = 8; 5,3 \times 10^8$ células/mL) con respecto al cultivo alimentado con hemina y BHI 5X. La captación de glucosa aumentó constantemente durante la fase logarítmica del cultivo y cayó aproximadamente un 60 % cuando las células entraron en la fase estacionaria (punto de tiempo de 50 h en adelante, **Figura 23.A**). En estas condiciones se obtuvo un rendimiento de 2,5 µg/mL de bFSH (**Figura 23.A**). El rendimiento de bFSH fue similar al obtenido a las 48 horas post inducción del primer lote, comprobándose que la supresión de la hemina y BHI no afectaron considerablemente este parámetro durante esta ventana de tiempo.

En estos cultivos iniciados a una densidad celular baja, el metabolismo energético celular parece impulsar la proliferación celular sobre la producción de proteínas recombinantes, una tendencia que se revierte cuando las células entran en la fase estacionaria (**Figura 23.A**). Por lo tanto, se llevó a cabo un nuevo experimento que evita la fase de latencia del cultivo e induce la producción de proteínas recombinantes en la fase logarítmica media. Se comenzó el cultivo con una densidad celular 3 veces mayor (OD_{600} de 0,45) que la utilizada en experimentos anteriores (**Figura 23.B**), esto dio como resultado la ausencia de una fase de latencia y un aumento lineal de la densidad celular hasta el día 2 (44 h, OD_{600} 8), que disminuyó 1,5 unidades OD en las siguientes 28 h (OD_{600} 6,5 a las 72 h). A diferencia del cultivo iniciado a baja densidad celular, que mostró la mayor captación de glucosa en la fase logarítmica tardía (50 h; **Figura 23.A**), el pico principal de captación de glucosa en el cultivo comenzado a mayor densidad celular se produjo antes, a mitad de la fase logarítmica (30 h; **Figura 23.B**). Para este cultivo, también se indujo la producción de proteína recombinante a las 24 h de inoculado el biorreactor, pero al doble de densidad celular ($OD_{600} \sim 4$). Curiosamente, este enfoque condujo a un aumento lineal en la producción de rbFSH hasta el final del experimento (día 3). Este comportamiento condujo a un aumento del 14 % en la

cantidad total de rbFSH secretada al sobrenadante del cultivo (2,9 µg/mL de rbFSH **Figura 23.B**) respecto al segundo lote (**Figura 23.A**).

Tanto en el segundo como en el tercer lote de producción se realizó la cosecha del sobrenadante de cultivo a las 48 horas post inducción y se obtuvo un rendimiento un poco menor al alcanzado con el primer lote, cuya cosecha se efectuó a las 72 horas post inducción. No obstante, los sobrenadantes de los cultivos de 48 horas resultaron ser más límpidos lo cual simplificó el proceso de purificación y mejoró el rendimiento y calidad del producto final.

Durante el cuarto lote de producción en el biorreactor se indujo a una OD600 de 2,7, intermedia a la ensayada en el segundo y tercer lote. Se decidió suplementar el medio con hemina fresca a las 48 horas de iniciado el mismo, momento en el cual se observó una detención del crecimiento celular en el segundo y tercer lotes, los cuales no habían sido suplementados con este nutriente. No se observaron diferencias importantes en cuanto a la densidad celular máxima y el nivel de proteína recombinante producido bajo estas condiciones, obteniéndose un rendimiento similar de 2,7 µg/mL bFSH (ver **Anexo 2**).

De este modo se determinó que mediante el escalado del cultivo a un biorreactor de 3L fue posible duplicar los rendimientos obtenidos en escala de laboratorio (matraz). Este aumento en el rendimiento estuvo estricta y proporcionalmente relacionado a la biomasa de los cultivos en matraz (OD600 = 4) vs. biorreactor (OD600 = 8).

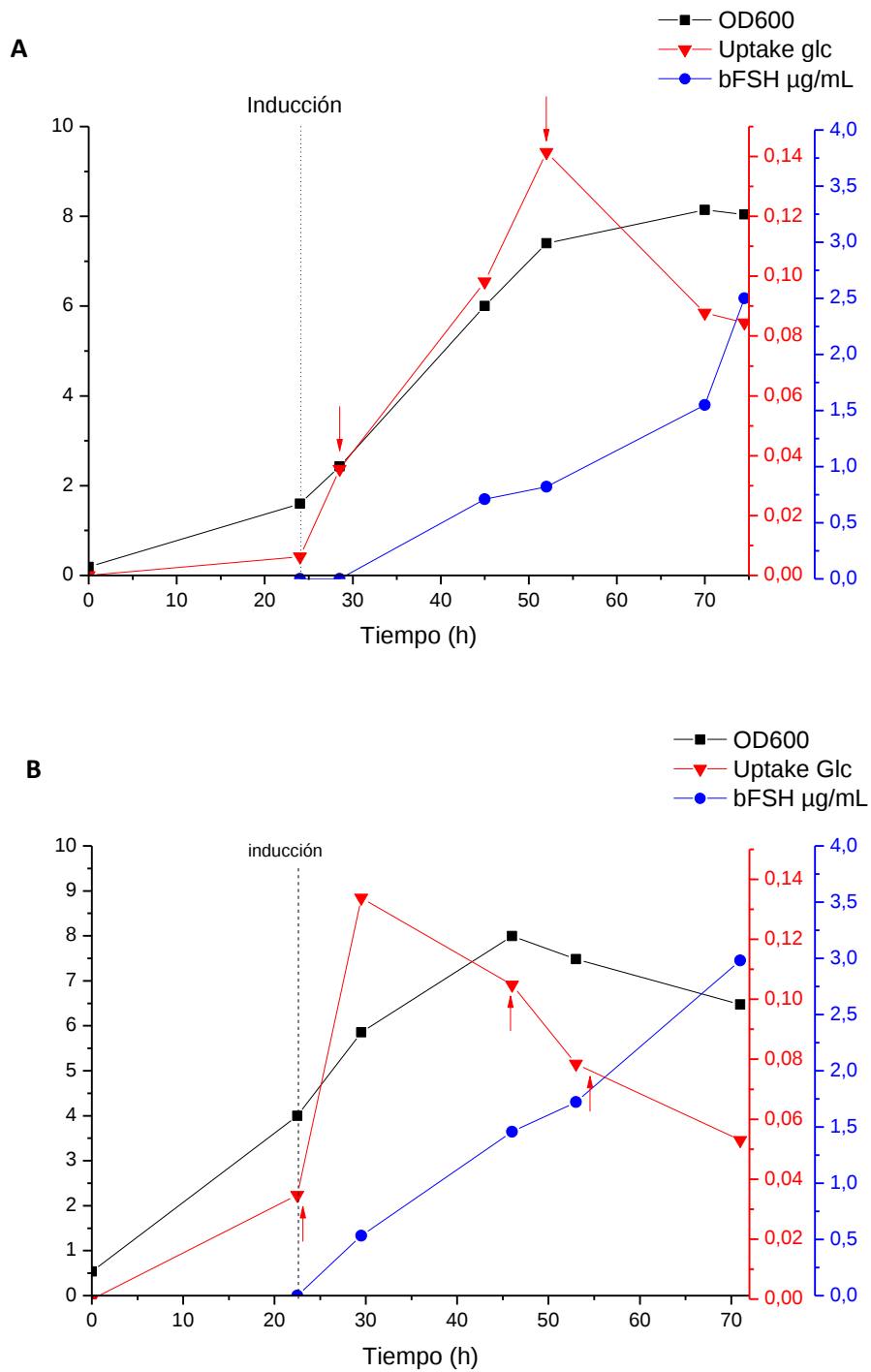


Figura 23. Cultivo en biorreactor de *L. tarentolae* productora de bFSH. Se monitoreó el crecimiento celular mediante la OD600, el consumo de glucosa (Uptake Glc en $\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$) y la producción de bFSH. **A** y **B** corresponden a los segundo y tercer lotes de producción, respectivamente, que difieren entre sí en la OD600 (1,5 y 4, respectivamente) a la cual se inicia la inducción de la expresión de bFSH. Las flechas rojas indican el momento en que el medio se suplementó con glucosa.

4.5 Purificación de bFSH

En el siguiente apartado se describe la optimización del proceso de purificación de bFSH a partir de sobrenadante de cultivos inducidos de *L. tarentolae* T7-TR bFSH_ HisTag _pLEXY_IE-blecherry4 clon 1.

4.5.1 Purificación mediante cromatografía de intercambio catiónico.

En primer lugar, se exploró la utilización de cromatografía de intercambio iónico ya que es una de las estrategias usadas preferencialmente en la industria como primer paso de purificación, la cual permite un enriquecimiento de la proteína de interés en un volumen significativamente menor al de la muestra original y el costo de este tipo de matrices es inferior a aquellas basadas en técnicas de afinidad. Por otra parte, existe una patente (WO 2008/098169) donde la bFSH es producida en células CHO y purificada mediante cromatografía de intercambio catiónico.

Para la purificación de la bFSH producida en *L. tarentolae* se siguió el protocolo descrito en dicha patente. En primer lugar, se ajustó el pH del sobrenadante de cultivo a 4,5 para facilitar la unión de la bFSH a la matriz de intercambio catiónico (Resource™ S), ya que esta proteína tiene un punto isoeléctrico teórico de 8. El sobrenadante de cultivo (50 mL) se cargó a la columna y se realizó un lavado con buffer fosfato de sodio pH 5,5 y otro con acetato de sodio 8 mM, NaCl 0,16 M. La elución de la bFSH se realizó con acetato de sodio 8 mM, NaCl 0,8 M. En la **Figura 24.A** se observa el perfil cromatográfico monitoreado como absorbancia a 280 nm en función de los volúmenes de retención (mL) e indicándose las fracciones recolectadas durante los lavados (B3, C3, C4, C5) y la elución (D1 y D2) para su posterior análisis por SDS-PAGE (**Figura 24.B**). Si bien en las fracciones correspondientes al lavado con acetato de sodio 8 mM, NaCl 0,16 M se observa una banda del peso molecular esperado (35 a 40 kDa), ensayos de *Western blot* evidenciaron que la proteína está presente en todas las fracciones correspondientes a los lavados y elución. Por lo que se considera que estas condiciones de purificación no resultan adecuadas para la purificación/enriquecimiento de la bFSH.

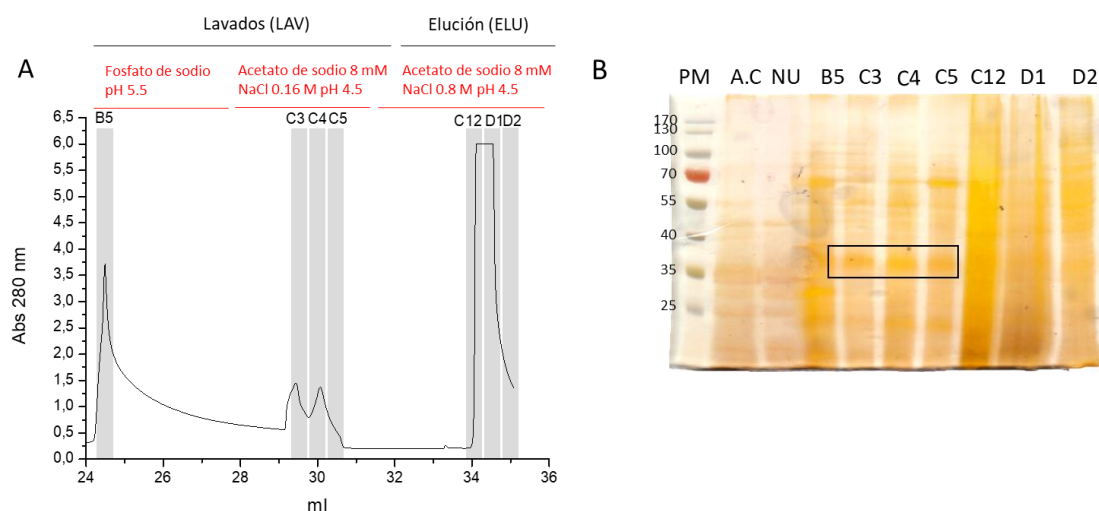


Figura 24. Purificación de bFSH por cromatografía de intercambio catiónico. El sobrenadante de cultivo ajustado a pH 4,5 se sembró en una columna Resource™ S, los lavados se realizaron con buffer fosfato de sodio pH 5,5 y con acetato de sodio 8 mM, NaCl 0,16 M. La elución se realizó con acetato de sodio 8 mM, NaCl 0,8 M. **A)** Perfil de elución obtenido en la cromatografía de intercambio catiónico. En gris se indican las fracciones colectadas. **B)** SDS-PAGE al 10% teñido con nitrato de plata (PM: marcador de peso molecular, AC: sobrenadante, NU: fracción no unida al intercambiador, B5, C3, C4, C5, C12, D1, D2: fracciones correspondientes a etapas de lavado o elución señaladas en el cromatograma).

4.5.2 Purificación mediante cromatografía de intercambio aniónico y catiónico.

Teniendo en cuenta que a pH 4,5 una gran proporción de las proteínas presentes en el sobrenadante se unen al intercambiador catiónico, se planteó como una segunda estrategia la inclusión de un paso previo de intercambio aniónico. Para ello, se ajustó el pH del sobrenadante de cultivo a 6,5 y se realizó una cromatografía de intercambio aniónico empleando una columna Resource™ Q equilibrada en buffer Bis-Tris 20 mM pH 6,5. Las proteínas unidas fueron eluidas con buffer Bis-Tris 20 mM NaCl 0,8 M pH 6,5. Dado que la bFSH tiene un punto isoeléctrico teórico de 8, a pH 6,5 la misma se encuentra cargada de forma positiva y por lo tanto se espera que no se una a la matriz aniónica. Este paso podría eliminar ciertos contaminantes con afinidad al intercambiador bajo estas condiciones de trabajo.

Posteriormente se ajustó el pH en 4,5 de la fracción no unida a la resina Resource™ Q, la cual se sembró en la columna de intercambio catiónico Resource™ S. En estas condiciones la bFSH estaría cargada de forma positiva y sería retenida por la matriz. Luego de sembrar la muestra se realizó un lavado con buffer fosfato de sodio pH 5,5,

seguido de un gradiente con NaCl 0,16 M y por último una elución por gradiente con NaCl 0,8M.

En la **Figura 25.A** se muestra el cromatograma obtenido durante la cromatografía de intercambio catiónico. Las fracciones obtenidas se analizaron mediante SDS-PAGE (**Figura 25.B**). Si bien esta estrategia permitió obtener una bFSH con mayor nivel de pureza (ej. fracción D10) como desventaja, este proceso de purificación presentó muy bajo rendimiento.

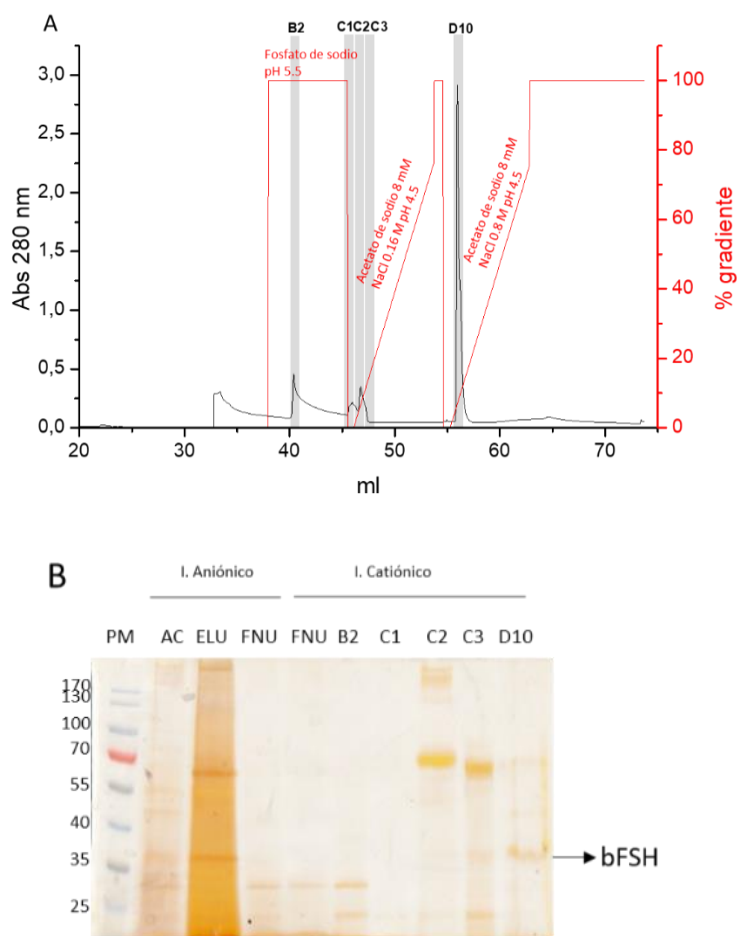


Figura 25. Purificación secuencial de bFSH mediante cromatografía de intercambio aniónico y catiónico.

A) Perfil de elución obtenido en la cromatografía de intercambio catiónico. En gris se indican las fracciones colectadas **B)** SDS-PAGE teñido con nitrato de plata. PM: Marcador de peso molecular; AC: sobrenadante; ELU: Eluído; FNU: fracción no unida a la matriz; B2, C1, C2, C3 y D10: fracciones indicadas en el cromatograma.

4.5.3 Purificación mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC).

Teniendo en cuenta que la bFSH se expresa fusionada a una etiqueta de afinidad de hexahistidina se procedió a intentar su purificación mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC).

Para la optimización de la purificación, las pruebas iniciales consistieron en sembrar 100 mL de sobrenadante en una columna de IMAC pre-empacada (His-Trap™ 1mL), la cual estaba previamente equilibrada en amortiguador A (fosfato de sodio 50 mM pH 7,4 con 150 mM NaCl) a un flujo de 1 mL/minuto. La columna cargada se lavó con amortiguador A, luego con amortiguador A conteniendo 5 mM de imidazol y posteriormente 40 mM de imidazol. Finalmente se realizó un gradiente de elución con amortiguador A imidazol 500 mM. Como se observa en la **Figura 26** ya en presencia de 40 mM de imidazol comienza a eluir parte de la proteína de interés, lo cual sugiere una interacción débil entre la bFSH y la matriz de níquel. Por otro lado, en el gradiente de elución se observó que a 150 mM de imidazol eluye una banda de peso molecular aparente similar al esperado y con alta pureza. Con el fin de recuperar la mayor cantidad de proteína posible en siguientes purificaciones se optó por no realizar el lavado con 40 mM de imidazol. Es importante destacar que en las preparaciones de uso veterinario se acepta la presencia de un porcentaje elevado de contaminantes, como es el caso de la FSH extractiva que se comercializa (Folltropin) y cuyo perfil proteico en un SDS-PAGE se observa en la **Figura 26.C**

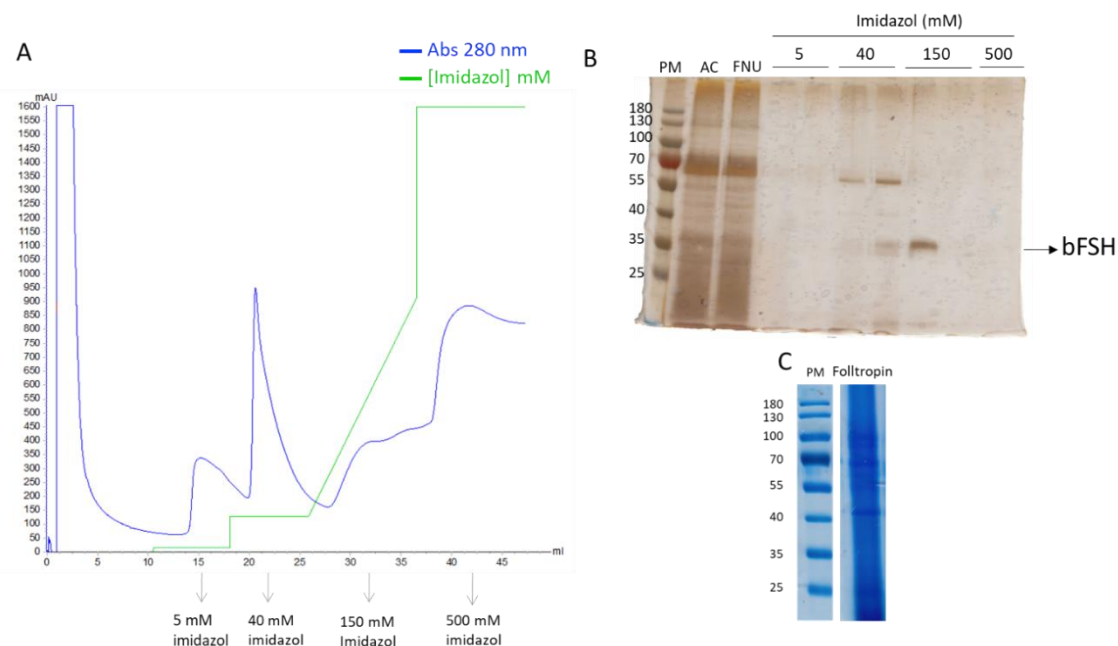


Figura 26. Purificación de bFSH mediante IMAC. Se sembraron 100 mL de sobrenadante de cultivo, se realizó el lavado con buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7,4 con 150 mM NaCl adicionado con 5 mM de imidazol y posteriormente con 40 mM de imidazol. La elución se realizó mediante gradiente con imidazol 500 mM **A)** Perfil de elución obtenido en la cromatografía. **B)** Análisis de las diferentes fracciones cromatográficas por SDS-PAGE y tinción con nitrato de plata. PM: Marcador de peso molecular; AC: sobrenadante; FNU: fracción no unida; 5 mM, 40 mM, 150 mM y 500 mM: fracciones de los lavados y elución indicadas en el cromatograma. **C)** Perfil proteico del Folltropin luego de una corrida en SDS-PAGE y teñido con *Coomassie blue*, PM: Marcador de peso molecular

Con el objetivo de escalar el proceso de purificación por IMAC se sembró 1 L de sobrenadante en la columna His-Trap™ de 1mL previamente equilibrada en amortiguador A. Luego del lavado con 5 mM de imidazol se ensayó un segundo lavado con 25 mM de imidazol, concentración intermedia a la utilizada en purificaciones previas. Como se observa en la **Figura 27** (fracción G3) con este segundo lavado con imidazol aún se pierde la proteína de interés. Es importante mencionar que una vez utilizada la columna se evidenció una pérdida de su color celeste característico dado por el níquel, esto podía indicar que el sobrenadante contiene algún componente capaz de quelar el níquel de la columna provocando su desprendimiento y la pérdida de capacidad adsortiva de la columna. Algunos autores han reportado que la hemina puede desplazar los iones de níquel de la resina de afinidad ⁵⁶, así como precipitar en el medio de cultivo, pudiendo influenciar el procesamiento de *downstream* ¹⁰⁶.

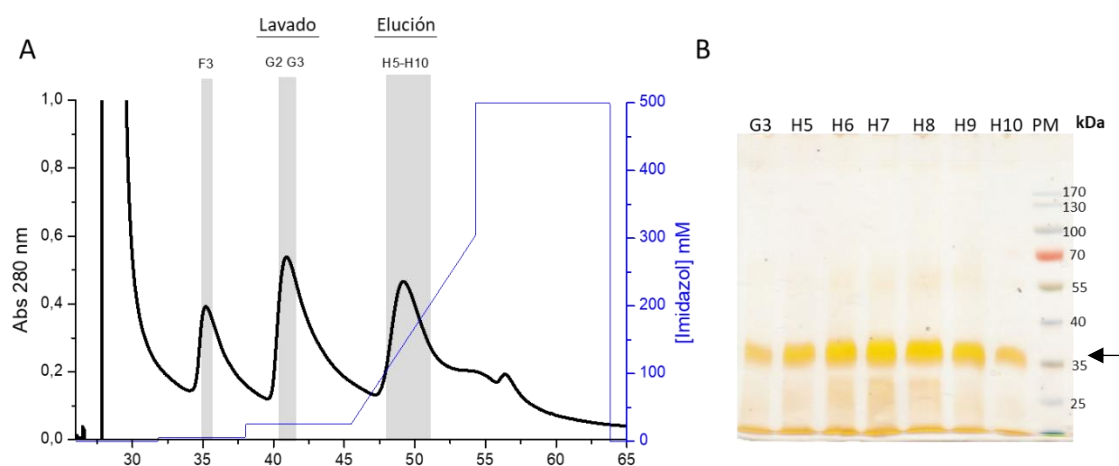


Figura 27. Purificación de bFSH mediante IMAC a partir de 1 L de sobrenadante de cultivo. A) Perfil de elución obtenido en la cromatografía. **B)** Análisis de las diferentes fracciones obtenidas durante la purificación por SDS-PAGE teñido con nitrato de plata. G3, H5, H6, H7, H8, H9, H10: fracciones indicadas en el cromatograma correspondientes al lavado y a la elución; PM: Marcador de peso molecular.

Con el objetivo de concentrar la muestra y al mismo tiempo intentar disminuir los agentes quelantes presentes en el medio de cultivo, se realizó una precipitación de la bFSH presente en el sobrenadante (40 mL) con sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) previo a su purificación por IMAC. Se realizaron dos precipitaciones sucesivas con una concentración salina de 0-40% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y de 40-75% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Las fracciones precipitadas, se resuspendieron en 4 mL de amortiguador A y se evaluaron por SDS-PAGE. Se procedió a utilizar la fracción precipitada con 40-75% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para la purificación por IMAC como se muestra en la **Figura 28.A**. Como control se purificaron por IMAC 40 mL del mismo sobrenadante de cultivo sin precipitar (**Figura 28.B**). Las fracciones eluidas se analizaron por SDS-PAGE, observándose que la pureza obtenida en la purificación a partir del precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fue menor principalmente debido a la presencia de una banda proteica contaminante de aproximadamente 60-65 kDa (**Figura 28.C**). Al comparar mediante ELISA las fracciones purificadas por IMAC se puede observar que en el caso del sobrenadante precipitado se recupera un 20% de la cantidad inicial mientras que en el caso del sobrenadante sin precipitar se recupera un 40% (**Figura 28.D**). Por lo tanto se concluye que la purificación por IMAC a partir del sobrenadante precipitado con 40-75% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ no resultó un método adecuado.

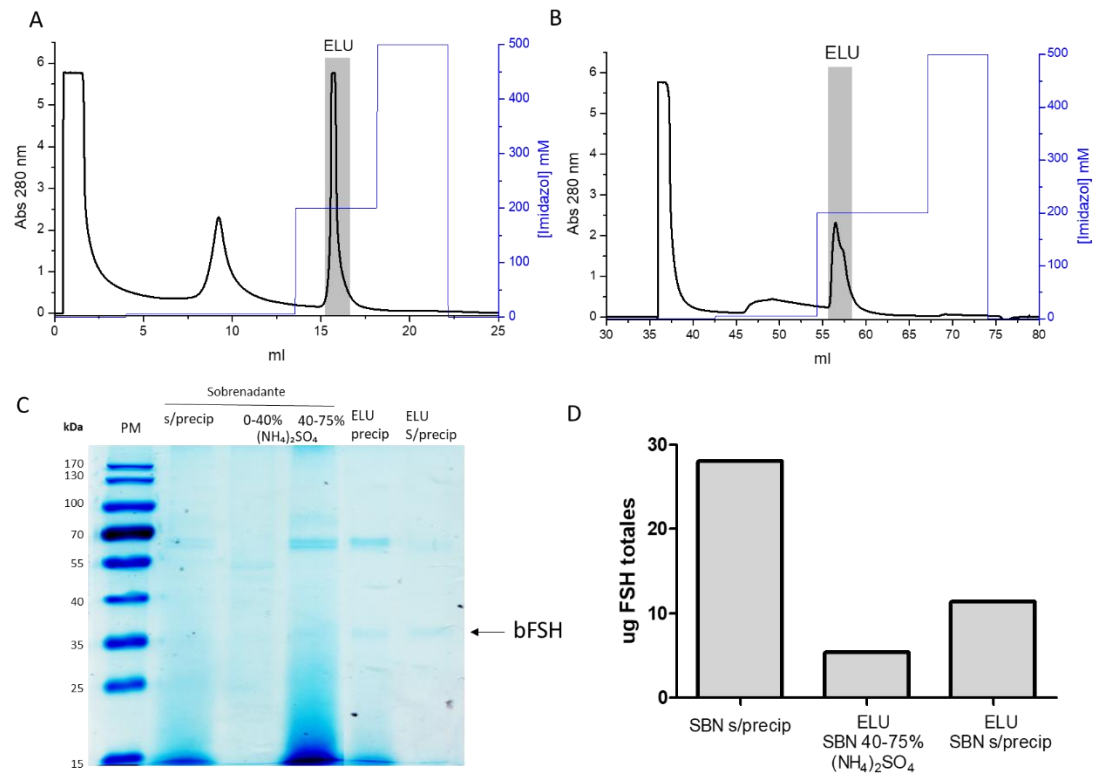


Figura 28. Precipitación con sulfato de amonio de la bFSH y posterior purificación por IMAC. A) Perfil cromatográfico obtenido en la IMAC luego de sembrar el sobrenadante precipitado con 40-75% de (NH₄)₂SO₄. **B)** Perfil cromatográfico obtenido en la IMAC luego de la siembra de sobrenadante sin precipitar. **C)** Análisis de las diferentes fracciones de las purificaciones por SDS-PAGE teñido con *Coomassie blue*. PM: Marcador de peso molecular, S/precip: sobrenadante sin precipitar, ELU precip: fracción indicada en el cromatograma A, ELU S/precip: fracción indicada en el cromatograma B; **D)** Evaluación por ELISA de la masa de bFSH recuperada en cada proceso de purificación.

Con el fin de reducir el volumen del sobrenadante y disminuir la cantidad de potenciales agentes quelantes en el mismo, se decidió realizar un paso de diálisis y concentración de la muestra en simultáneo, empleando un sistema de filtración tangencial. En este sistema, el flujo circula de forma paralela a la superficie de la membrana, a diferencia del sistema de filtración tradicional donde el flujo perpendicular a la superficie de la membrana provoca que se acumulen partículas sobre la superficie filtrante. El sistema de filtración tangencial permite que las partículas de mayor tamaño que el poro de la membrana no se acumulen ni tapen el filtro, sino que permanezcan en el flujo de recirculación. A su vez, este sistema permite concentrar y diafiltrar la muestra al mismo

tiempo. En nuestro caso, se realizó un intercambio parcial a amortiguador fosfato salino pH 7,4 (PBS). Se partió de 500 mL de sobrenadante de un cultivo en matraz, se lo concentró 10 veces y se realizó un cambio parcial del medio de cultivo a PBS. El porcentaje de recuperación de esta etapa de concentración cuantificado por ELISA fue del 90%. El sobrenadante concentrado se cargó en una columna His-Trap™ de 1 mL previamente equilibrada en amortiguador A, a un flujo de 1 mL/minuto. La columna cargada se lavó con amortiguador A con 5 mM de imidazol y las proteínas unidas fueron eluidas con 200 mM imidazol (**Figura 29.A**) y evaluadas por SDS-PAGE (**Figura 29.B**). Con el fin de eliminar el imidazol presente en la fracción eluída, se realizó diálisis contra PBS a 4°C empleando una membrana con tamaño de poro de exclusión de 10 kDa. En estas condiciones se alcanzó un rendimiento promedio de 0,6 mg de bFSH/litro de cultivo, recuperándose un 40% de la bFSH presente en el sobrenadante de cultivo. La concentración por filtración tangencial y el cambio parcial a PBS facilitó la purificación de la bFSH en un único paso cromatográfico.

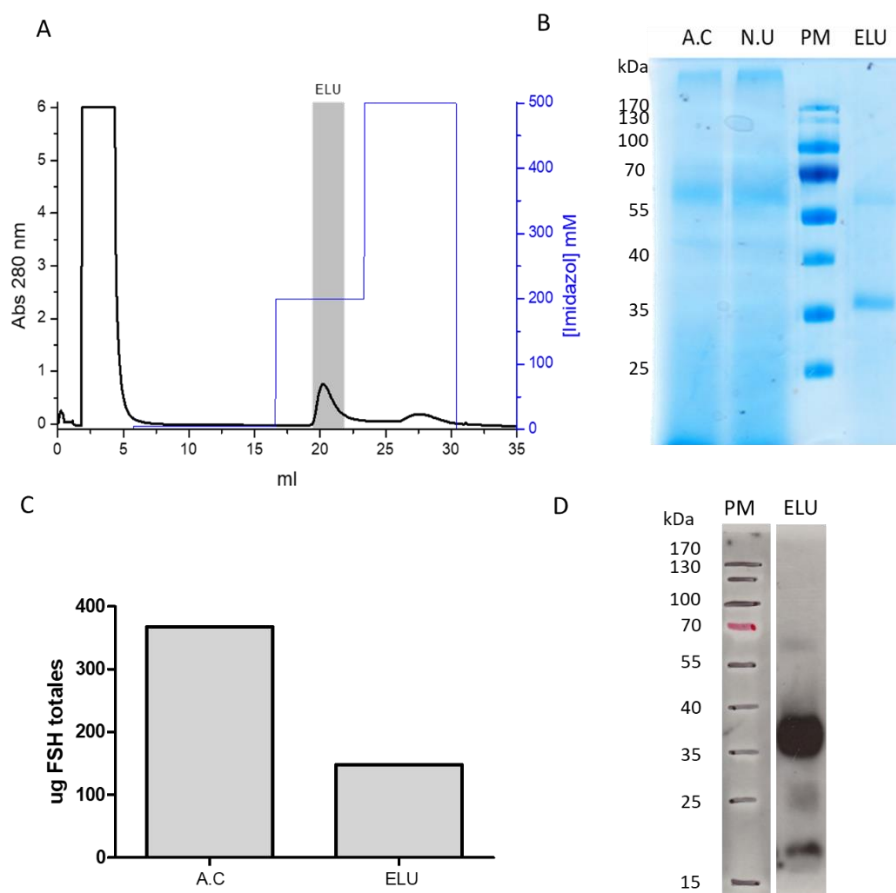


Figura 29. Purificación de bFSH mediante IMAC a partir de sobrenadante de cultivo concentrado por filtración tangencial. A) Perfil cromatográfico de la muestra de sobrenadante concentrado, dializado por

filtración tangencial y sembrado en una columna IMAC. **B)** Análisis de las diferentes fracciones por SDS-PAGE teñido con *Coomassie blue*. AC: sobrenadante concentrado y dializado, NU: Fracción no unida a la columna, PM: Marcador de peso molecular, ELU: fracción de elución indicada en el cromatograma. **C)** Evaluación de la bFSH recuperada luego de concentrar y diafiltrar (AC), y luego de purificada (ELU) determinada por ELISA. **D)** Evaluación de la fracción eluída por *Western blot* empleando anti-bFSH.

Este mismo procedimiento de concentración empleando filtración tangencial y purificación mediante IMAC se aplicó al sobrenadante proveniente del biorreactor (3L). Además del lavado con amortiguador A con 5 mM de imidazol, se realizó un lavado con 25 mM de imidazol y las proteínas unidas fueron eluídas con 200 mM de imidazol (**Figura 30.A**). La fracción eluída se analizó por SDS-PAGE (**Figura 30.B**). Con el fin de eliminar el imidazol presente en la fracción eluída y así acondicionarla para su utilización para posteriores ensayos *in vitro* e *in vivo*, se realizó una diálisis contra buffer PBS a 4°C empleando una membrana con tamaño de poro de exclusión de 10 kDa. En estas condiciones se alcanzó un rendimiento promedio de 1,2 mg de bFSH/litro de cultivo, recuperándose un 40% de la bFSH inicial. Durante el escalado a biorreactor tanto las condiciones metabólicas de cultivo como de stress mecánico no son idénticas, lo cual puede provocar que la composición del sobrenadante sea diferente, impactando en el proceso de purificación. La banda con el peso molecular correspondiente a la proteína recombinante, indicada con una flecha en la **Figura 30.B**, fue analizada por espectrometría de masa (MS) en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica del Institut Pasteur de Montevideo. Se confirmó que esta banda corresponde a la bFSH con un porcentaje de cobertura de secuencia del 24% (Ver **Anexo 3**). Esta muestra fue tratada en condiciones estándar de reducción y alquilación. Para mejorar la cobertura y considerando que la bFSH presenta gran cantidad de puentes disulfuro se puso a punto el proceso de reducción y alquilación, eligiendo como mejor condición la reducción con DTT 55 mM durante 30 minutos a 30°C y la alquilación con IAM 275 mM por 1 hora a temperatura ambiente. En estas condiciones fue posible mejorar el porcentaje de cobertura de secuencia alcanzando el 76% y evidenciándose tanto el extremo amino terminal como el carboxilo terminal, lo cual nos permite comprobar que la proteína expresada y secretada por *L. tarentolae* retiene su integridad molecular (Ver resultado en **Anexo 4**). En la **Figura 30.C** se puede observar que parte de los contaminantes de bajo peso molecular son reconocidos por el anticuerpo anti-bFSH. Las bandas

contaminantes fueron analizadas por espectrometría de masa (MS). Se pudo comprobar que las bandas de menor peso molecular corresponden a la bFSH, identificándose el *tag* de histidinas N-terminal en todas las muestras (Ver **Anexo 5**). Esto sugiere cierta degradación proteolítica de la bFSH a partir de su extremo C-terminal.

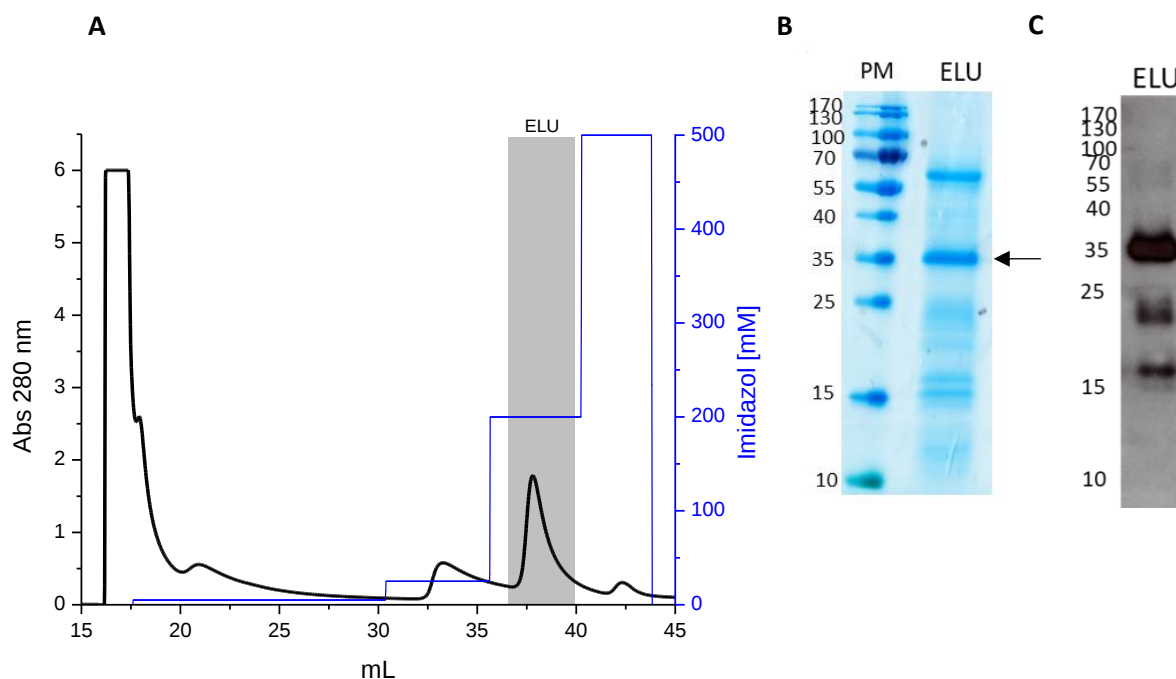


Figura 30. Purificación de bFSH mediante IMAC a partir de sobrenadante de cultivo concentrado por filtración tangencial. **A)** Perfil cromatográfico de la muestra de sobrenadante de biorreactor concentrado mediante filtración tangencial y sembrado en columna IMAC. **B)** Análisis de la fracción de elución por SDS-PAGE teñido con *Coomassie blue*. ELU: fracción indicada en gris en el cromatograma, PM: marcador de peso molecular. La flecha indica la banda correspondiente a la bFSH. **C)** Evaluación de la fracción de elución mediante *Western blot* y revelado con el anti-bFSH.

4.6 Determinación de la actividad biológica de FSH

4.6.1. Optimización de la valoración biológica *in vitro* utilizando preparados comerciales.

Una vez obtenida la proteína con cierto grado de pureza se buscó comprobar su funcionalidad biológica, para ello se realizó como primera aproximación un ensayo *in vitro*. El sistema empleado para evaluar la actividad biológica *in vitro* de la hormona

evalúa la capacidad de la FSH de disparar la generación de AMPc en células CHO-K1 que sobre-expresan su receptor (FSH-R)⁹⁸⁻¹⁰⁰.

Con el objetivo de optimizar el ensayo de actividad biológica *in vitro*, inicialmente se emplearon diferentes muestras comerciales de FSH: i) extracto de glándulas pituitarias porcinas con actividad FSH (Folltropin, Vetoquinol), ii) FSH porcina purificada por técnicas cromatográficas a partir de glándulas pituitarias (FSH Prospect, HOR-285), iii) FSH humana recombinante producida en células CHO (Puregon, Merck) y iv) standard internacional de FSH humana recombinante (FSH NIBSC 08/282). Para todas las muestras se realizó un duplicado biológico y un duplicado técnico. En la **Figura 31** se muestran los resultados obtenidos utilizando las diferentes moléculas de FSH a dos dosis diferentes 10 UI/mL y 5 UI/mL. El *fold increase* corresponde a la tasa de incremento de AMPc intracelular respecto a la condición basal sin estímulo. Se puede observar que, a mayor dosis de hormona, mayor producción de AMPc. Sin embargo, la misma dosis de las diferentes hormonas no produjo el mismo efecto. Por ejemplo, las muestras de FSH recombinante humana (Puregon y FSH NIBSC) indujeron niveles muy similares de AMPc. Mientras que las preparaciones extractivas de FSH muestran mayor poder inductor de producción de AMPc que las anteriores (**Figura 31.A**). De estas últimas, se destaca el folltropin que produjo un incremento >1,5 respecto del resto de las preparaciones. Vale la pena destacar que este efecto biológico superior por parte de los productos extractivos se debe a que se trata de preparaciones complejas, compuestas por otras proteínas además de la FSH que podrían promover la producción de AMPc de manera inespecífica, es decir independiente de la interacción con el receptor de FSH. En resumen, el bioensayo demostró ser capaz de generar AMPc en respuesta a diferentes fuentes de FSH y de manera dosis dependiente.

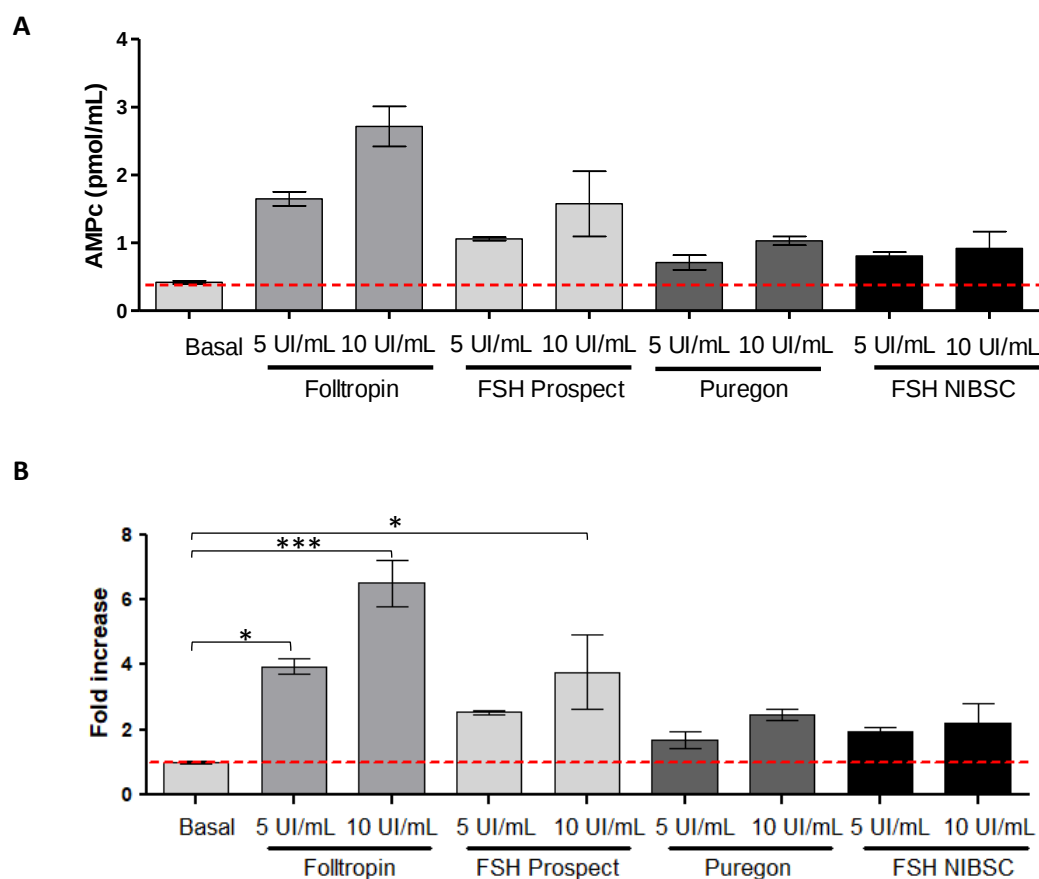


Figura 31. Evaluación de la actividad biológica *in vitro* de FSH derivada de diferentes preparaciones comerciales. A) Acumulación de AMPc intracelular en respuesta a dos dosis de FSH. **B) Fold increase:** Las barras corresponden a la tasa de incremento de AMPc intracelular luego del estímulo con FSH (Folltropin, FSH Prospect, Puregon y FSH NIBSC) respecto al medio de cultivo solo (Basal), para todas las muestras se realizó un duplicado biológico y un duplicado técnico. Se indican los casos en que hubo diferencia estadísticamente significativa con la condición basal, * = $P \leq 0,05$; *** = $P \leq 0,001$

4.6.2 Evaluación de la actividad biológica *in vitro* de bFSH producida en *L. tarentolae* y purificada por IMAC.

Habiendo comprobado la funcionalidad del bioensayo para detectar actividad FSH, se procedió a evaluar la actividad biológica *in vitro* de la bFSH producida en biorreactor y purificada por IMAC (**Figura 30.B**) de dos lotes independientes de producción. Como control positivo de actividad se utilizó Folltropin. Los resultados de la **Figura 32** muestran que la bFSH purificada por IMAC es capaz de inducir la producción de AMPc ya que su respuesta es superior al valor basal. Sin embargo, se observa una relación inversa entre

dos y actividad para los dos lotes de producción ensayados. Este comportamiento podría ser indicativo de un efecto inhibitorio ejercido por un componente de la muestra, ya que a mayor cantidad de muestra menor es el *fold increase* de AMPc. Posiblemente alguno de los contaminantes presentes en las preparaciones esté causando este efecto.

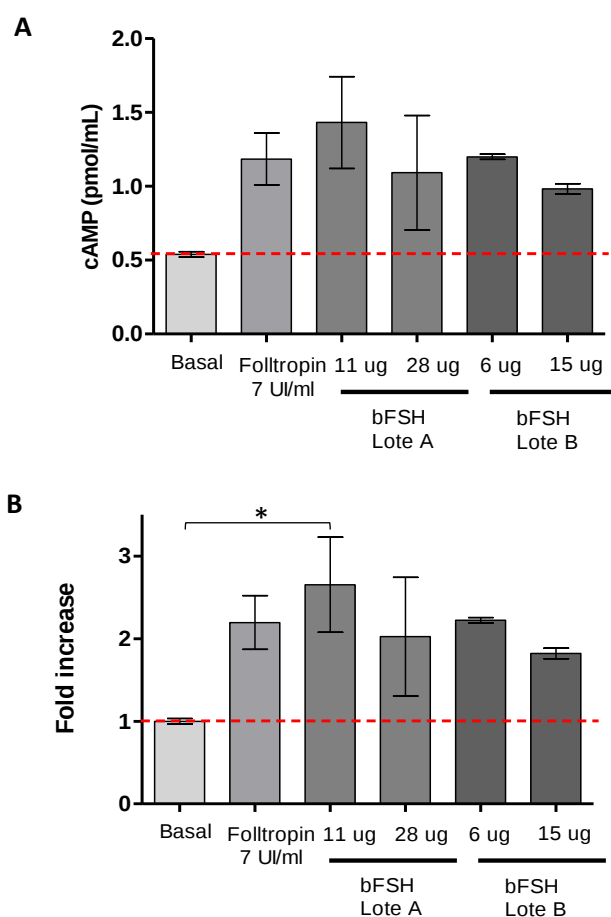


Figura 32. Evaluación de la actividad biológica *in vitro* de bFSH purificada mediante IMAC. Para todas las muestras se realizó un duplicado biológico y un duplicado técnico. **A)** Acumulación de AMPc intracelular en respuesta a bFSH. **B)** *Fold increase*: Las barras corresponden a la tasa de incremento de AMPc intracelular respecto a la condición basal. Se indican el caso en que hubo diferencia estadísticamente significativa con la condición basal, * = $P \leq 0,05$.

4.6.3 Actividad biológica *in vitro* de bFSH producida por *L. tarentolae*, purificada por IMAC e Intercambio catiónico.

Obtener un mayor grado de pureza siempre es deseable en preparaciones de proteínas recombinantes y en el caso particular de la bFSH producida por *L. tarentolae*, permitiría

eliminar contaminantes que pudieran estar interfiriendo o inhibiendo la actividad biológica de la FSH. Con este fin se añadió un segundo paso cromatográfico al proceso de purificación. Luego de realizar la IMAC a partir de sobrenadante concentrado, se llevó a cabo una cromatografía de intercambio catiónico (Resource™ S) ajustando previamente el pH de la fracción purificada por IMAC a 4,5. Para la elución se aumentó la concentración de NaCl a 480 mM. El exceso de NaCl presente en el eluido, se eliminó mediante diálisis contra PBS a 4°C, empleando una membrana con tamaño de poro de exclusión de 10 kDa. Como se observa en la **Figura 33**, disminuye notoriamente la concentración del contaminante de mayor peso molecular (cercano a los 70kDa), pero se concentran contaminantes de menor peso molecular que como se mencionó anteriormente (sección 4.5.3 figura 29.D y 30.C) corresponden a porciones hidrolizadas de la bFSH. El porcentaje de recuperación luego de los dos pasos de purificación fue del 12% según los datos de ELISA obtenidos.

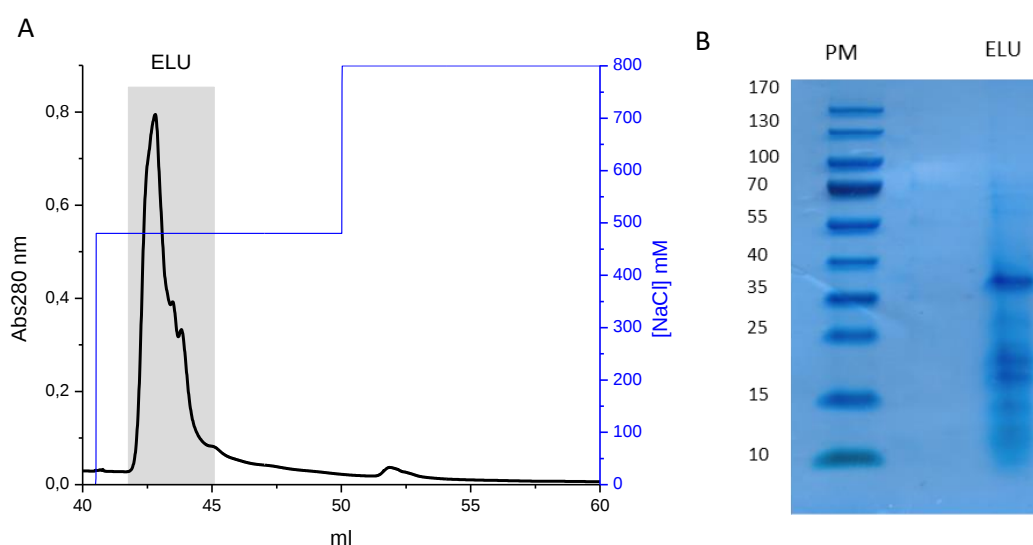


Figura 33. Purificación por IMAC e Intercambio catiónico de bFSH producida en biorreactor. A) Perfil cromatográfico del intercambio catiónico. ELU: fracción eluída con 480 mM de NaCl **B)** Análisis de la fracción de elución por SDS-PAGE al 15% y tinción con *Coomassie blue*. PM: Marcador de peso molecular.

Una vez obtenida la bFSH purificada por IMAC e intercambio iónico se evaluó su actividad biológica *in vitro*, utilizando Puregon como control positivo de actividad. Los resultados muestran que la bFSH purificada por IMAC e intercambio iónico indujo la

producción de AMPc y que esta inducción fue proporcional a la concentración de proteína recombinante (**Figura 34**).

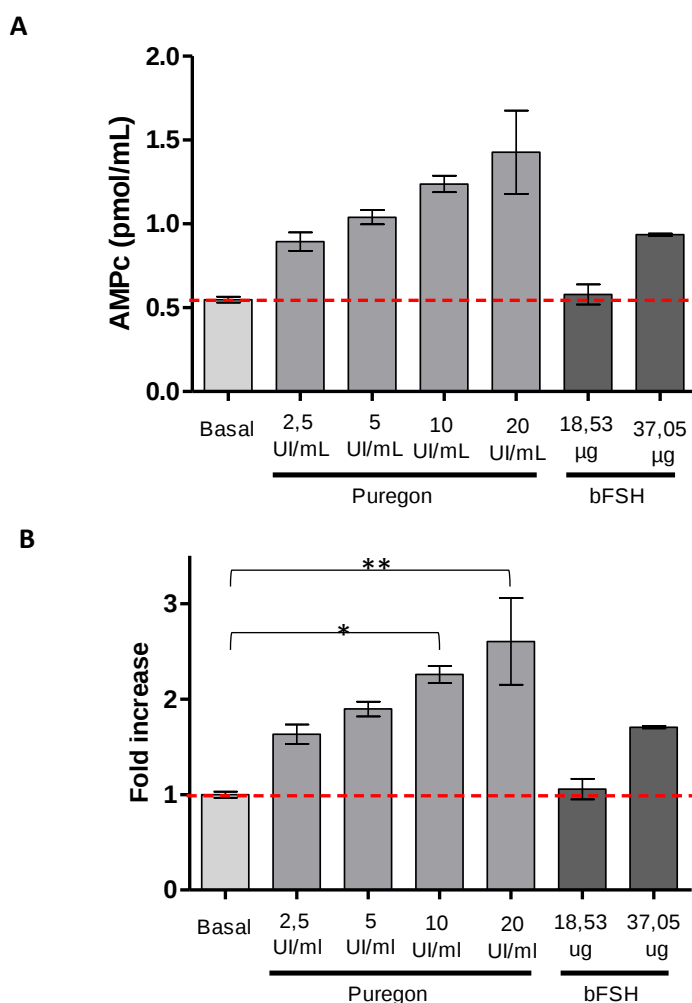


Figura 34. Evaluación de la actividad biológica *in vitro* de bFSH purificada mediante IMAC e Intercambio iónico. A) Acumulación de AMPc intracelular en respuesta a bFSH. **B)** *Fold increase*: las barras corresponden a la tasa de incremento de AMPc intracelular respecto a la condición basal. Para todas las muestras se realizó un duplicado biológico y un duplicado técnico. Se indican los casos en que hubo diferencia estadísticamente significativa con la condición basal, * = $P \leq 0,05$; ** = $P \leq 0,01$

Estos resultados confirmaron que la eliminación del principal contaminante mediante la cromatografía de intercambio catiónico produjo la respuesta esperada en el ensayo biológico. No obstante, debe destacarse que este bioensayo posee una baja sensibilidad ya que se deben utilizar dosis altas de los estándares de la hormona para detectar un incremento en la producción de AMPc. Por otra parte, como se mencionó anteriormente, el mismo también presenta una especificidad relativa ya que moléculas

capaces de inducir un aumento en la concentración intracelular de AMPc pueden dar lugar a señal positiva. Por lo tanto, éste debe ser utilizado como una aproximación inicial previo a los ensayos *in vivo*.

4.6.4 Optimización de la purificación por cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) empleando lavados con mayor concentración de imidazol

Considerando el bajo rendimiento obtenido luego de la purificación por IMAC e intercambio catiónico se evaluó nuevamente la purificación por IMAC incorporando lavados con mayor contenido de imidazol. Si bien los resultados previos mostraron que parte de la bFSH se perdía durante estos lavados, se optó por realizar la purificación por IMAC incorporando un lavado con 40 mM de imidazol (**Figura 35.A**). Las fracciones correspondientes al lavado y eluido se analizaron por SDS-PAGE (**Figura 35.B**). Como se puede observar, mediante este paso de lavado se obtuvo la proteína de interés con mayor grado de pureza, reduciéndose marcadamente el contaminante de mayor peso molecular (cercano a los 70kDa) y con una recuperación del 30% de la bFSH inicial de acuerdo a la cuantificación por ELISA.

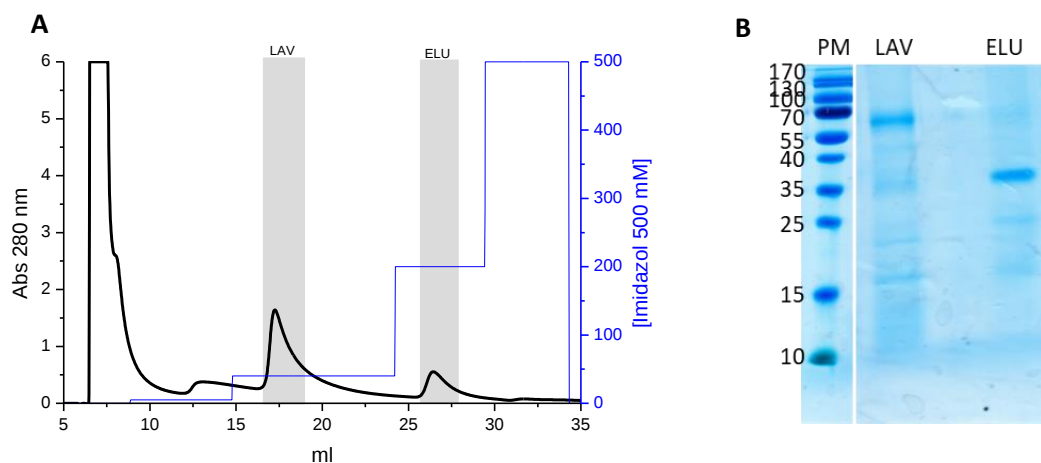


Figura 35. Purificación de bFSH mediante IMAC y posterior lavado con 40 mM de Imidazol. A) Perfil cromatográfico del sobrenadante de cultivo del biorreactor concentrado mediante filtración tangencial. **B)** Análisis de las diferentes fracciones obtenidas por SDS-PAGE teñido con *Coomassie blue*, PM: marcador de peso molecular, LAV y ELU fracciones indicadas en el cromatograma correspondientes al lavado y elución, respectivamente.

4.6.5 Ensayos de Actividad biológica *in vivo*

Para la estimación de la potencia de la bFSH se empleó el ensayo *in vivo* aceptado internacionalmente y descrito en Farmacopea Europea (Ph.Eur 01/2008:0719). Brevemente, este ensayo evalúa el efecto de la hormona sobre el peso promedio (mg) de los ovarios de ratas (n=6 por dosis evaluada) luego de la inyección sub-cutánea de tres dosis en progresión geométrica del estándar y tres dosis de la muestra a evaluar. Los ensayos fueron realizados en el Laboratorio BIO FUCAL S.A. de Buenos Aires, Argentina.

Se llevó a cabo un primer ensayo de estimación de la potencia *in vivo* para la bFSH purificada por IMAC incluyendo ésta un lavado con 25 mM de imidazol (**Figura 36.A**). Los resultados de este ensayo mostraron que esta preparación de bFSH promueve un pequeño aumento del peso de ovarios en comparación con el control sin estimular, siendo el promedio del peso de los ovarios de la dosis media $75,03 \pm 4,35$ mg y en el caso del control $63,9 \pm 9,5$. Sin embargo, al igual que lo observado en el ensayo *in vitro*, parecería haber una inhibición de la actividad, observándose una relación inversa entre dosis y respuesta (**Figura 36.B**) (Ver **Anexo 6.A** para los valores del peso de ovarios de los animales individuales).

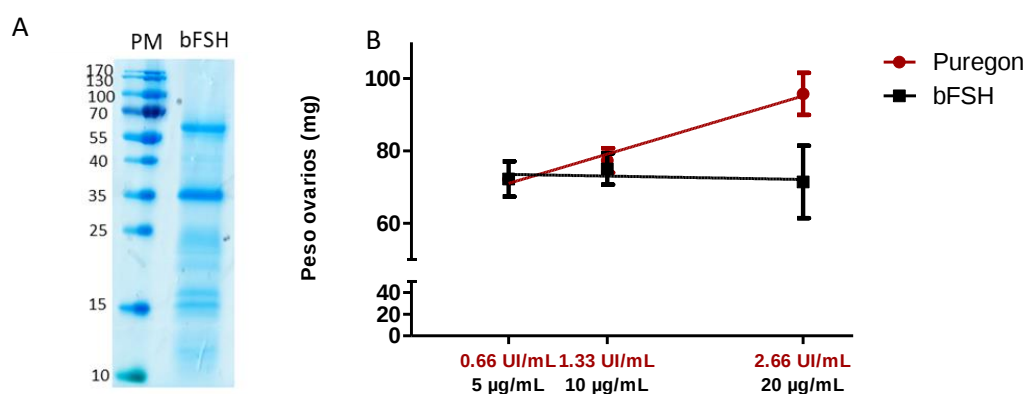


Figura 36. Valoración de la actividad biológica *in vivo* de bFSH purificada por IMAC empleando lavado con 25 mM de imidazol A) SDS-PAGE al 15%, correspondiente a una muestra purificada por IMAC y lavado con 25 mM de imidazol, tinción con *Coomassie blue*. B) Peso promedio (mg) de los ovarios de ratas (n=6 por dosis evaluada) luego de la inyección sub-cutánea de tres dosis (0,66 - 1,33 y 2,66 UI/mL) del estándar Puregon (rojo) y tres dosis (5 µg/mL, 10 µg/mL y 20 µg/mL) de la muestra bFSH (negro).

Posteriormente, se realizó el ensayo de actividad biológica *in vivo* para la bFSH purificada por IMAC e intercambio catiónico (**Figura 37.A**). Los resultados de este ensayo se muestran en la **Figura 37.B** donde se puede observar que hay una relación lineal dosis-respuesta con las diferentes concentraciones de bFSH ensayadas. Aplicando el análisis de varianza se pudo determinar que este ensayo cumplió satisfactoriamente con los criterios de regresión ($p < 0,01$) y linealidad ($p > 0,05$), no así con el de paralelismo ($p > 0,05$; paralelismo entre la curva del estándar y la muestra ensayada). La falta de paralelismo puede deberse a que las dosis de bFSH utilizadas fueron demasiado bajas, siendo la concentración de esta en la preparación de 82 $\mu\text{g/mL}$ (Ver **Anexo 6.B** para los valores de peso de ovarios por animal).

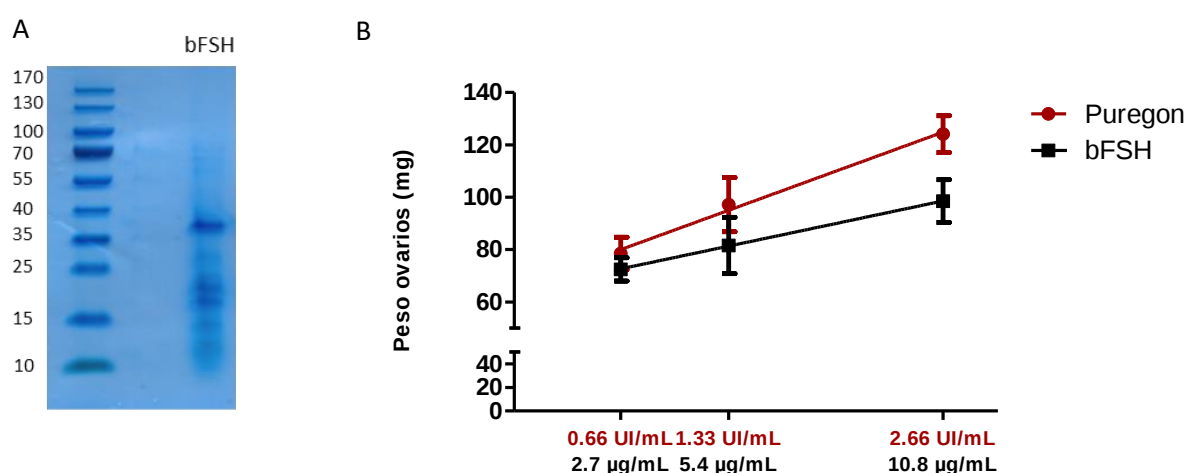


Figura 37. Valoración de la actividad biológica *in vivo* de bFSH purificada por IMAC e Intercambio iónico.

A) SDS-PAGE al 15% correspondiente a la muestra analizada, tinción con *Coomassie blue*. **B)** Peso promedio (mg) de los ovarios de ratas ($n=6$ por dosis evaluada) luego de la inyección sub-cutánea de tres dosis (0,66 - 1,33 y 2,66 UI/mL) del estándar Puregon (rojo) y tres dosis (2,7 $\mu\text{g/mL}$, 5,4 $\mu\text{g/mL}$ y 10,8 $\mu\text{g/mL}$) de la muestra bFSH (negro).

Para cada una de las muestras de bFSH analizada *in vivo* se observó el mismo efecto en la relación dosis-respuesta que en el ensayo *in vitro*. Esto refuerza la idea que la primera preparación contiene un inhibidor de la actividad de FSH (ej. contaminante) o bien que parte de la bFSH se encuentra en una conformación capaz de unirse al receptor, pero no activarlo, bloqueándolo e impidiendo que otras moléculas con conformaciones activas se unan al mismo.

Se repitió el ensayo de actividad biológica *in vivo* para la bFSH purificada por IMAC e intercambio catiónico utilizando concentraciones mayores (Figura 38.A). Los resultados de este ensayo se muestran en la **Figura 38.B**, aplicando el análisis de varianza se pudo determinar que este ensayo cumplió satisfactoriamente con los criterios de regresión ($p < 0,01$), linealidad ($p > 0,05$) y paralelismo ($p > 0,05$; paralelismo entre la curva del estándar y la muestra ensayada), pudiéndose así calcular una potencia de 14 UI/mL. Considerando que la concentración de la preparación fue 262,6 $\mu\text{g/mL}$, se obtuvo una actividad biológica específica de 56,3 UI/mg (Ver **Anexo 6.C** para los valores de peso de ovarios por animal).

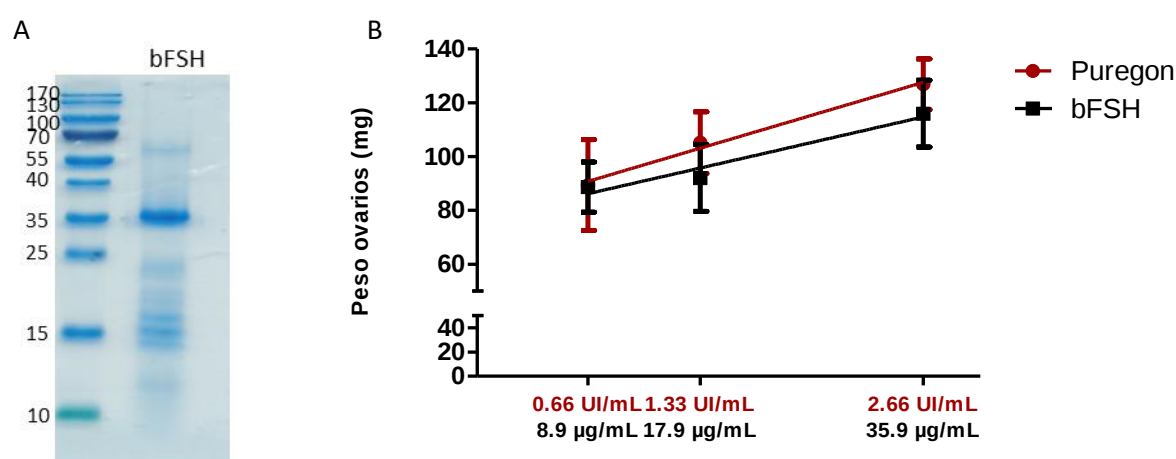


Figura 38. Valoración de la actividad biológica *in vivo* de bFSH purificada por IMAC e Intercambio iónico.

A) SDS-PAGE al 15% correspondiente a la muestra analizada, tinción con *Coomassie blue*. **B)** Peso promedio (mg) de los ovarios de ratas ($n=6$ por dosis evaluada) luego de la inyección sub-cutánea de tres dosis (0,66 - 1,33 y 2,66 UI/mL) del estándar Puregon (rojo) y tres dosis (8,9 $\mu\text{g/mL}$, 17,9 $\mu\text{g/mL}$ y 35,9 $\mu\text{g/mL}$) de la muestra bFSH (negro).

Para comprobar si la purificación en un solo paso por IMAC incorporando el lavado con 40 mM de imidazol (**Figura 39.A**) resultó eficiente en remover los contaminantes con acción inhibitoria sobre la actividad de la hormona, se realizó el ensayo de actividad biológica *in vivo* con la muestra obtenida en estas condiciones (**Figura 39.B**). Aplicando el análisis de varianza se pudo determinar que este ensayo también cumplió satisfactoriamente con los criterios de regresión ($p < 0,01$), linealidad ($p > 0,05$) y paralelismo ($p > 0,05$; paralelismo entre la curva del estándar y la muestra ensayada). La

potencia calculada fue de 4 UI/mL, considerando que la concentración de la preparación era 90,7 $\mu\text{g/mL}$, se obtuvo como resultado una actividad biológica específica de 44,4 UI/mg (Ver **Anexo 6.D** para los valores de peso de ovarios por animal). Por lo tanto, la actividad específica de la bFSH obtenida mediante ambas estrategias cromatográficas se encuentra en el mismo orden de magnitud, lo cual confirma que dichos procedimientos no alteraron la actividad de la hormona recombinante.

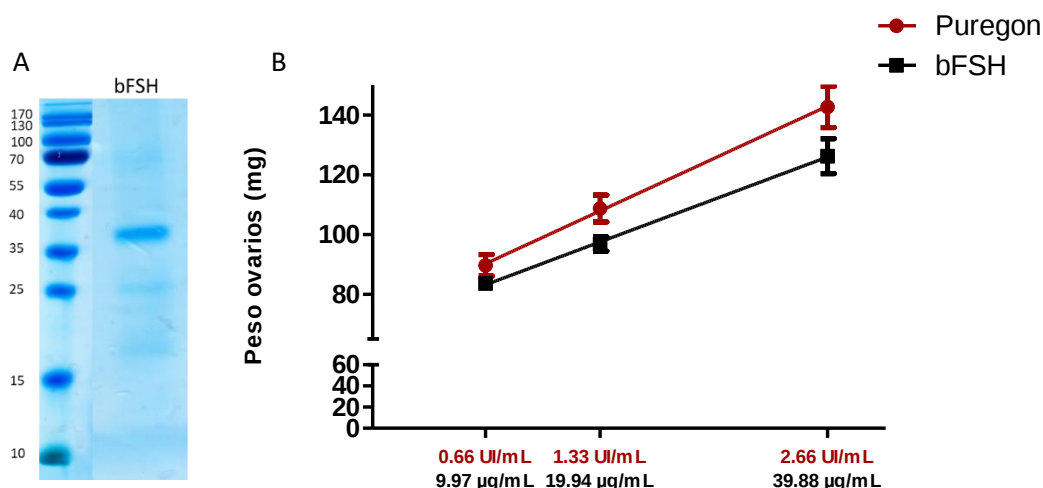


Figura 39. Valoración de la actividad biológica *in vivo* de bFSH purificada por IMAC empleando lavado con 40 mM de imidazol. A) SDS-PAGE al 15% correspondiente a la purificación de la muestra, tinción con *Coomassie blue*. **B)** Peso promedio (mg) de los ovarios de ratas (n=6 por dosis evaluada) luego de la inyección sub-cutánea de tres dosis (0,66 - 1,33 y 2,66 UI/mL) del estándar Puregon (rojo) y tres dosis (9,97 $\mu\text{g/mL}$, 19,94 $\mu\text{g/mL}$ y 39,88 $\mu\text{g/mL}$) de la muestra bFSH (negro).

4.7 Caracterización bioquímica de la bFSH recombinante producida en *L. tarentolae*

4.7.1 Cromatografía de exclusión molecular

La conformación oligomérica de la bFSH se estudió mediante cromatografía de exclusión molecular (del inglés SEC) analítica.

El cromatograma de SEC obtenido para la bFSH purificada por IMAC empleando un lavado con 25mM de imidazol muestra tres picos principales (**Figura 40**). Parte importante de la preparación proteica eluye en el volumen de exclusión de la columna, por lo que se asume un peso molecular aparente mayor a 75 kDa (Fracción A de la **Figura 40**). El segundo pico presenta un volumen de retención equivalente a una especie con

una masa molecular de ~ 37 kDa (Fracción B de la **Figura 40**) compatible con el peso molecular esperado para un monómero de la molécula. El tercero correspondería a moléculas del entorno de los 7 kDa. En el SDS-PAGE mostrado en la **Figura 40** se analizan las muestras en ausencia de agente reductor (condiciones de corrida) y en presencia de DTT. En la fracción A sin la adición de DTT se observan agregados de alto peso molecular y una pequeña cantidad de la proteína de interés, mientras que en la fracción A en presencia de DTT se observan moléculas de 60 kDa y 15 kDa aproximadamente. La fracción C no se detecta en gel debido a su bajo peso molecular y concentración. Estos resultados muestran que en esta preparación proteica está presente la bFSH en estado monomérico junto con agregados de alto peso molecular. Estos agregados se disocian en condiciones reductoras y parecerían estar formados por porciones de la bFSH ya que son reconocidos por un anticuerpo anti-bFSH por *Western blot* (**Figura 40**).

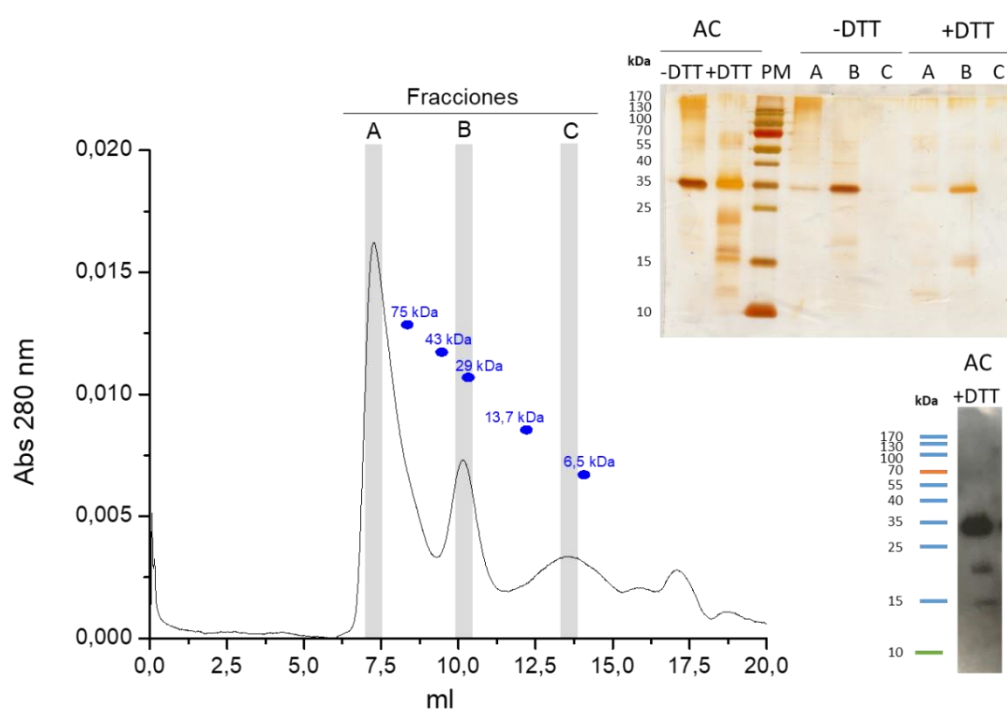


Figura 40. Cromatografía de exclusión molecular de la bFSH. La fracción de bFSH purificada por IMAC (lavado con 25 mM de imidazol) fue analizada en una columna Superdex 75 10/300. En azul se muestran los datos de calibración de la columna. En el cromatograma se indican en gris las fracciones analizadas por SDS-PAGE al 15%, el cual fue teñido con nitrato de plata y revelado por *Western blot* para bFHS. AC: muestra aplicada a la columna (bFSH purificada por IMAC con lavado 25 mM imidazol).

El cromatograma de SEC obtenido para la bFSH purificada por IMAC e Intercambio iónico se muestra en la **Figura 41**, donde se observa un pico mayoritario (fracción D) que es coherente con el peso molecular aparente del monómero de bFSH. En el SDS-PAGE de la **Figura 41** las fracciones A, B, C no se detectan en el gel debido a la baja concentración de proteína, la fracción D muestra la banda correspondiente a la bFSH y dos bandas de bajo peso molecular, las cuales bajo condiciones no reductoras migran en la SEC con un peso molecular aparente cercano a los 35 kDa. Estos resultados muestran que esta preparación proteica presenta mayoritariamente la bFSH en estado monomérico.

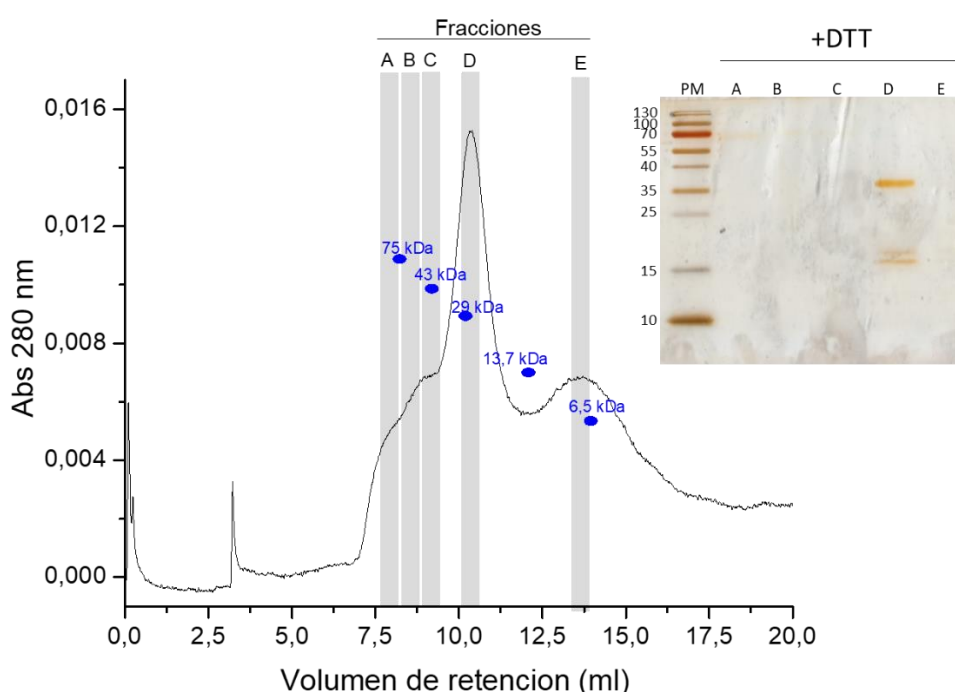


Figura 41. Cromatografía de exclusión molecular de la bFSH purificada por IMAC e intercambio catiónico. La muestra de la bFSH fue aplicada en una columna Superdex 75 10/300. En azul se muestran los datos de calibración de la columna. En el cromatograma se indican en gris las fracciones analizadas por SDS-PAGE al 15% en condiciones reductoras y teñido con nitrato de plata.

4.7.2 Análisis del patrón de glicosilación e identificación de sitios glicosilados

La bFSH presenta cuatro sitios potenciales de N-glicosilación del tipo Asn-X-Thr (donde X puede ser cualquier aminoácido), para mayor detalle ver la secuencia disponible en **Anexo 1**. En primer lugar, se estudió si la bFSH producida en *L. tarentolae* se encontraba N-glicosilada. Para ello, se realizó la digestión de la proteína purificada con la glicoamidasas F (PNGasa F) que cliva el enlace entre el GlcNAc y el residuo de Asparagina.

La bFSH se identificó por *Western blot* utilizando un anticuerpo anti-bFSH. Como se observa en la **Figura 42** la bFSH producida en *L. tarentolae* está glicosilada ya que luego del tratamiento con la enzima, la hormona disminuye su peso molecular aparente, el cual se corresponde con el teórico para la proeteína con *tag* de histidina y no glicosilada (PM= 29 kDa).

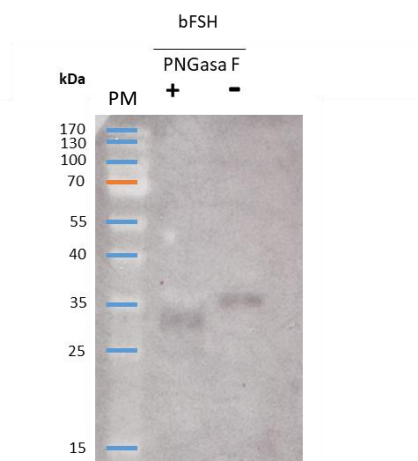


Figura 42. Evaluación de presencia de N-glicosilación en la bFSH expresada en *L. tarentolae*. *Western blot* utilizando anticuerpo específico anti-bFSH. PM: Marcador de peso molecular (kDa), bFSH tratada con PNGase F (+), o bFSH sin tratar con PNGase F (-)

Análisis de sitios glicosilados

Buscando profundizar en la caracterización de la molécula y con el objeto de determinar si los cuatro posibles sitios de glicosilación que presenta la construcción se encontraban modificados, la proteína tratada y sin tratar con PNGase F fue analizada por espectrometría de masa (MS). La digestión con PNGase F se realizó a partir de una banda escindida de un gel de SDS-PAGE, para ello se corrieron dos carriles con la muestra de interés y se cortó la banda específica correspondiente a la bFSH en cada uno de ellos. También se escindió un fragmento de gel sin proteína que se utilizó como muestra blanco del proceso de deglicosilación. Se eliminó el colorante *Coomassie blue* de los fragmentos y se realizó la reducción y alquilación de las piezas de gel. Luego se agregó PNGase F al fragmento de gel control sin proteína y a uno de los fragmentos correspondientes a la bFSH. El otro fragmento con la proteína de interés se utilizó como control y no se le agregó PNGase F. Se realizaron lavados para colectar los glicanos liberados (analizados más adelante) y las piezas de gel fueron sometidas a un proceso

de digestión con tripsina para su análisis por MS. La PNGasa F, al hidrolizar el enlace entre el glicano y la asparagina de la proteína glicosilada, produce la liberación del glicano y la desaminación de asparagina a ácido aspártico. Por lo tanto, si la asparagina se encuentra glicosilada, la masa molecular observada luego de la digestión con PNGasa F debe ser 1 Da mayor que la predicha en la secuencia original ¹⁰⁷. Los resultados obtenidos indican que los cuatro sitios putativos de N-glicosilación presentes en la proteína están glicosilados, como se muestra en la **Figura 43** se detectó un incremento de 1 Da en los péptidos que corresponden a secuencias conteniendo residuos de asparagina glicosilables. Los péptidos de interés fueron fragmentados con el fin de confirmar sus secuencias. Por otro lado, estos péptidos no se logran detectar en la muestra de bFSH sin tratar con PNGasa F (ver **Anexo 7**).

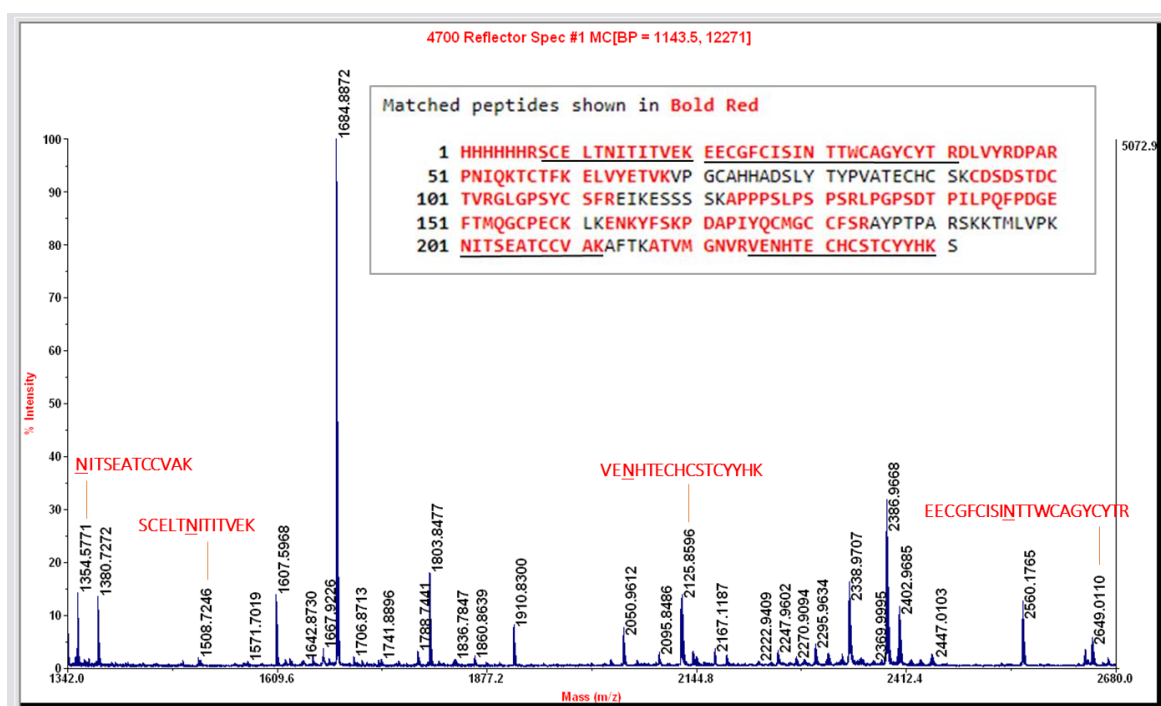


Figura 43. Espectro de masa obtenido en modo deflector positivo para la bFSH producida en *L. tarentolae* y tratada con PNGasa F. En rojo se indican las señales correspondientes a los péptidos que contienen los sitios de N-glicosilación donde la asparagina (N) se modificó a ácido aspártico (+1Da). En el recuadro se indican subrayados los péptidos glicosilados identificados en la secuencia.

Análisis de Glicanos

Para el análisis de los N-glicanos liberados por acción de la PNGasa F se trabajó en colaboración con el grupo de la Dra. Karina Mariño del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME, Buenos Aires, Argentina). El procedimiento consistió en la marcación fluorescente con 2-AB de los glicanos liberados y la separación mediante una combinación de cromatografía líquida de alto rendimiento de interacción hidrofílica (*hydrophilic interaction ultrahigh performance liquid chromatography*) y detección de marcación fluorescente acoplada (HILIC-UPLC-FLR).

En la **Figura 44.A** se muestra el cromatograma obtenido y en la **Figura 44.B** la estructura preliminar de la caracterización de N-glicanos, donde se puede observar que el pico mayoritario correspondiente a las unidades de glucosa (GU) 4,27 min tiene casi el 60% del área, mientras que los picos restantes a 3,93-4,37-4,90-5,25-5,67 min están menos representados cuantitativamente.

A partir de bases de datos y literatura se puede realizar una asignación preliminar del pico 2 mayoritario y designado como M3, que correspondería a una conformación GlcNAc2Man3. Esta estructura está descrita en glicoproteínas expresadas en *L. tarentolae* como la EPO y la proteína precursora alfa-amiloide soluble^{77,108}. El pico 1 no se correlacionó con ninguna estructura descrita en la literatura previamente. Del pico 3 se puede realizar una asignación preliminar como FM3, la cual tendría una conformación de GlcNAc2(Fuc)Man3. Los picos 4 y 5 podrían corresponder a A1:GlcNAc2Man3GlcNAc y FA1:GlcNAc2(Fuc)Man3GlcNAc / A2:GlcNAc2Man3GlcNAc2 / M4:GlcNAc2Man4 respectivamente, mientras que el pico a 6 podría corresponder a M5 (GlcNAc2Man5) (**Figura 44.B**).

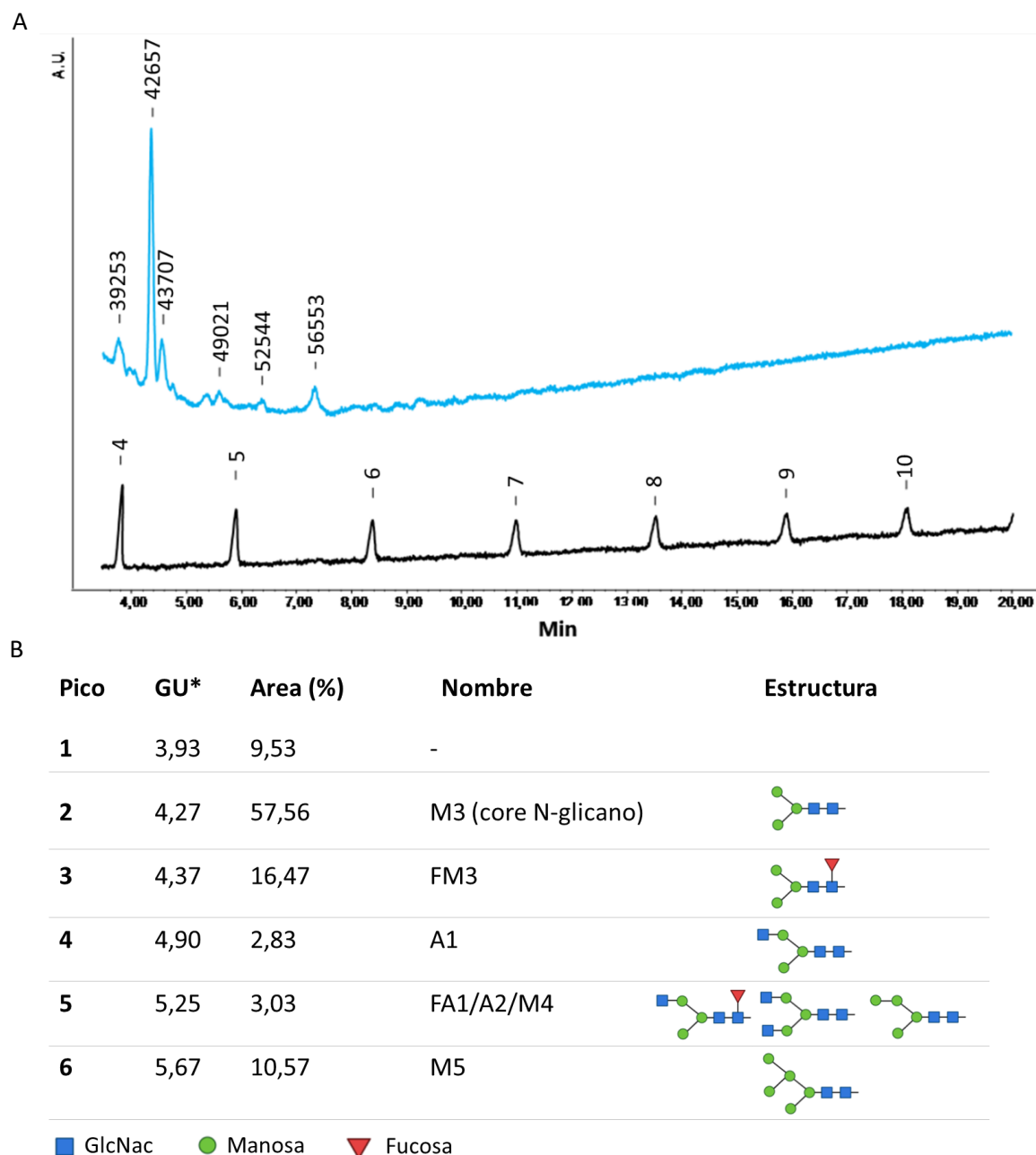


Figura 44. Perfil cuali y cuantitativo de la composición de glicanos de la bFSH producida por *L. tarentolae*. **A)** Perfil cromatográfico de HILIC-UPLC-FLR obtenido para los glicanos liberados de la bFSH. Las etiquetas de los picos están expresadas en GU (unidades de glucosa). A.U: unidades arbitrarias de fluorescencia. **B)** Caracterización de los picos obtenidos y estructuras preliminares de los N-glicanos derivadas del análisis del cromatograma. * Error en valores GU +/- (0.06-0.1).

Para confirmar la asignación preliminar de identidad de los glúcidos se realizó un análisis mediante digestión con las exoglicosidasas $\alpha(1-2,3,6)$ manosidasa y $\alpha(1-2,3,4,6)$ fucosidasa, los resultados se muestran en la **Figura 45**. La digestión con fucosidasa no altera el perfil de los N-glicanos, mientras que la digestión con manosidasa digiere por

completo los picos 2 y 5, validando la asignación del pico 2 como Man3 y descartando A2 como posible estructura para el pico 5. Los picos 1, 3 y 5 también desaparecen, lo que valida el pico 3 como FM3 y el pico 5 como M4 y no como FA1. Finalmente analizando la digestión con manosidasa se puede descartar que el pico 4 corresponda a A1. Se realizó la digestión con manosidasa de la RNAsa B, la cual es una glicoproteína que presenta N-glicanos con alta cantidad de manosas y se comprobó que el valor de GU obtenido para el pico 6 corresponde a M5.

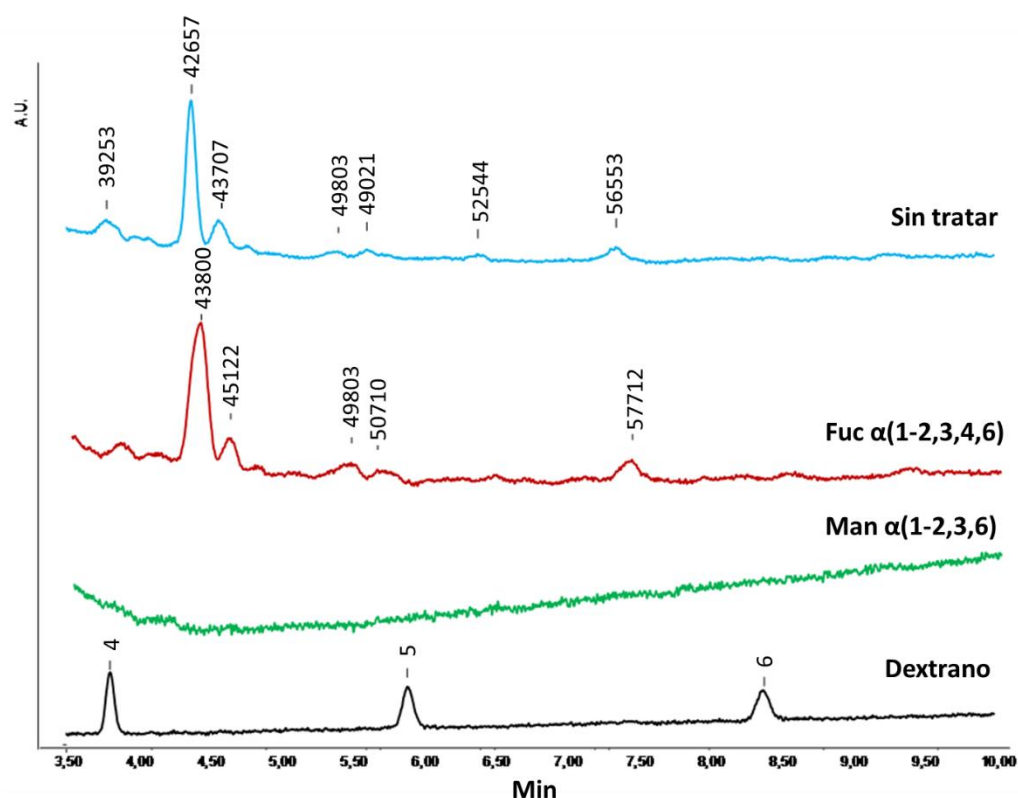


Figura 45. Perfil cromatográfico de HILIC-UPLC-FLR de los glicanos presentes en la bFSH de una muestra tratada o no con $\alpha(1-2,3,6)$ manosidasa y $\alpha(1-2,3,4,6)$ fucosidasa. Las etiquetas de los picos están expresadas en GU. AU: unidades arbitrarias de fluorescencia.

En resumen, mediante el análisis de glicosilación de la bFSH producida en el sistema de *L. tarentolae* se determinó que todos los sitios posibles se encontraban N-glicosilados y que dicha glicosilación es homogénea y principalmente del tipo Man3 (GlcNAc2Man3). Si bien *L. tarentolae* es capaz de producir glúcidos bi antenarios complejos galactosilados y fucosilados, el perfil de glicosilación obtenido fue simple, no detectándose picos con altos valores de GU (unidades de glucosa, correspondientes a N-glicanos

multiantenarios complejos), lo que concuerda con lo descrito para otras proteínas expresadas en *L. tarentolae* ^{71,77}. Incluso los valores bajos de GU permiten descartar la presencia de estructuras bi antenarias galactosiladas, lo cual también se encuentra en línea con lo reportado en la literatura ⁷¹.

Dentro de las posibles estrategias para mejorar la glicosilación de las proteínas recombinantes se encuentra la modificación genética del sistema de expresión a través de la incorporación o eliminación de glicosiltransferasas ¹⁰⁹. En este sentido, considerando que el ácido siálico regula directamente la respuesta inmune e influye en la vida media de las glicoproteínas, para aumentar la calidad o similitud de bFSH recombinantes a la nativa se podría incorporar la vía de biosíntesis del ácido siálico a *L. tarentolae*, la cual no está presente en el parásito ⁵⁴. De esta manera se podría humanizar el perfil de glicosilación de *L. tarentolae*, incorporando el gen de la transialidasa (TS). La TS es una enzima que puede transferir ácido siálico a glicoproteínas endógenas, la cual se ha expresado de forma exitosa en células de insecto y levaduras ⁵⁴. Otra alternativa viable es la manipulación de los componentes del medio de cultivo, por ejemplo, suplementando con fuentes de carbono alternativas, por ejemplo en células CHO está reportado que la adición de galactosa al medio de cultivo modifica el perfil de glicosilación obteniendo glicanos con galactosas terminales ¹¹⁰. No hemos encontrado registros de que estas estrategias mencionadas anteriormente hayan sido exploradas en *L. tarentolae*, lo cual se plantea como perspectivas a explorar en esta plataforma de expresión.

4.7.3 Pruebas de estabilidad de la bFSH

El estudio de la estabilidad de una proteína de uso terapéutico es esencial para determinar su comportamiento en medios fisiológicos y para el desarrollo de formulaciones que impacten positivamente en su actividad biológica, seguridad, vida útil y calidad. En general, las proteínas poco estables tienden a ser fácilmente degradadas por proteasas del huésped y consecuentemente, a ser rápidamente eliminadas del organismo.

Se realizó una aproximación inicial al estudio de la estabilidad a través del almacenamiento a diferentes temperaturas y mediante el análisis de la homogeneidad

de la muestra por SEC. Para ello se empleó gel filtración de la bFSH el mismo día de su purificación por IMAC con lavado 40 mM o luego de su almacenamiento durante 7 días a 4°C o durante 30 días a -20°C.

En los días 7 y día 30 se centrifugó la muestra y se inyectaron 400 µL (100 µL menos que en el día 0) a la SEC. En la **Figura 46** se observan los resultados obtenidos, el área correspondiente a cada pico se expresó como porcentaje respecto al total del área bajo la curva. Prácticamente no se observan cambios en la homogeneidad y calidad de la bFSH en las muestras correspondientes a los días 0 y 7. Por el contrario, en la muestra correspondiente al día 30 disminuyó el primer pico que corresponde a proteína excluida de la columna y comienzan a aparecer picos con pesos moleculares estimados menores a 6.5 kDa.

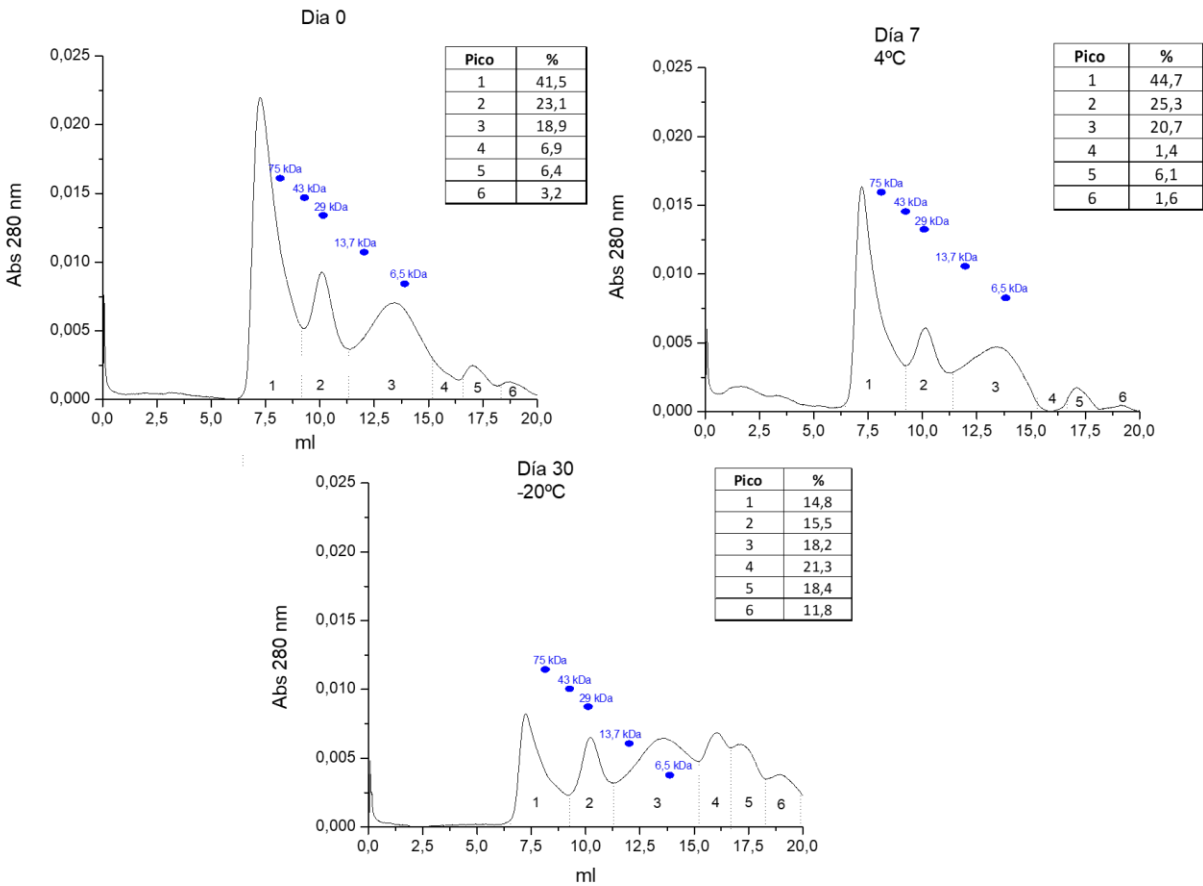


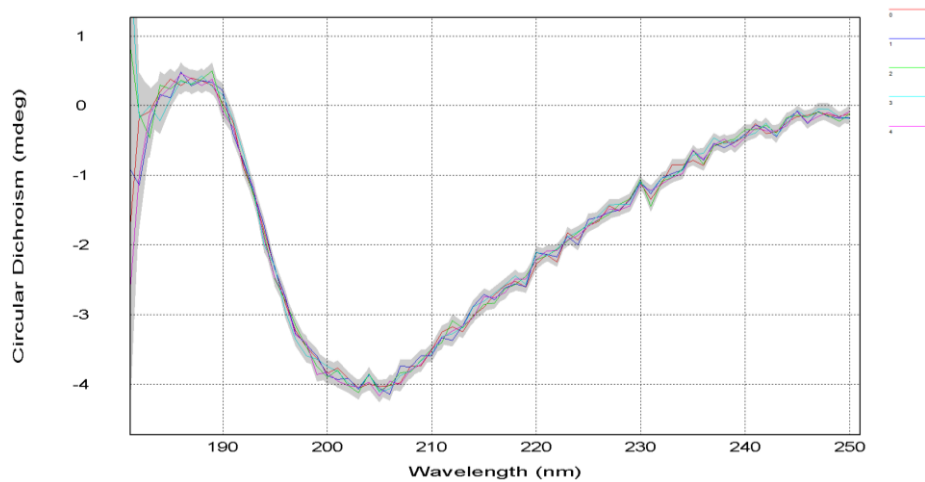
Figura 46. Estabilidad de la bFSH a diferentes temperaturas y tiempos de almacenamiento. Análisis mediante SEC analítica utilizando columna Superdex 75 10/300. En azul se muestran los datos de calibración de la columna. Se muestran las gráficas correspondientes al Día 0, 7 (conservada a 4°C) y 30 (conservada a -20°C). Las tablas indican el área correspondiente a cada pico expresada como porcentaje respecto al total del área bajo la curva.

El dicroísmo circular (DC) es una técnica valiosa para el estudio de la estructura de proteínas en solución. La señal medida en DC es la diferencia entre la Absorbancia de la luz polarizada circularmente hacia la izquierda y hacia la derecha. En proteínas, los cromóforos de interés incluyen el enlace peptídico (absorción por debajo de 240 nm), cadenas laterales de aminoácidos aromáticos (absorción en el rango de 260 a 320 nm) y enlaces disulfuro (absorción alrededor de 260 nm). Mediante el estudio por DC de proteínas se puede obtener información de la composición de la estructura secundaria ya que los diferentes tipos de estructuras dan lugar a espectros de DC característicos en el UV lejano. Además, es posible obtener información de la estructura terciaria a partir de espectros en la región del UV cercano (260–320 nm) que surgen de los aminoácidos aromáticos ¹¹¹.

Mediante DC se realizó un análisis preliminar de la estructura secundaria y estabilidad térmica. En la **Figura 47.A** se muestra el espectro en UV lejano para la bFSH caracterizado por una abundancia de estructura de hoja plegada β la cual como característica presenta un mínimo a 217 nm y un máximo a 195 nm. Esto concuerda con lo descrito para la FSH ¹⁵. Posteriormente se estudió la estabilidad térmica de la bFSH, sometiendo a la muestra a incrementos secuenciales de temperatura desde 20°C a 70°C. Los registros de los espectros de CD de la bFSH adquiridos a las diferentes temperaturas no mostraron diferencias significativas en sus perfiles, siendo prácticamente superponibles entre sí (**Figura 47.B**). Esto permite concluir que la bFSH producida en *L. tarentolae* presenta una estructura secundaria estable dentro de este rango de temperatura. Probablemente la elevada proporción de puentes disulfuro intracatenarios contribuya a dicha estabilidad.

Está reportado que entre los 61°C y los 64°C el heterodímero de la bFSH se encuentra un 50% disociado ¹¹². La estructura terciaria puede estudiarse a partir del espectro DC en el UV cercano, sin embargo, en los espectros obtenidos no se pudo obtener dicha información debido a la baja concentración de proteína utilizada.

A



B

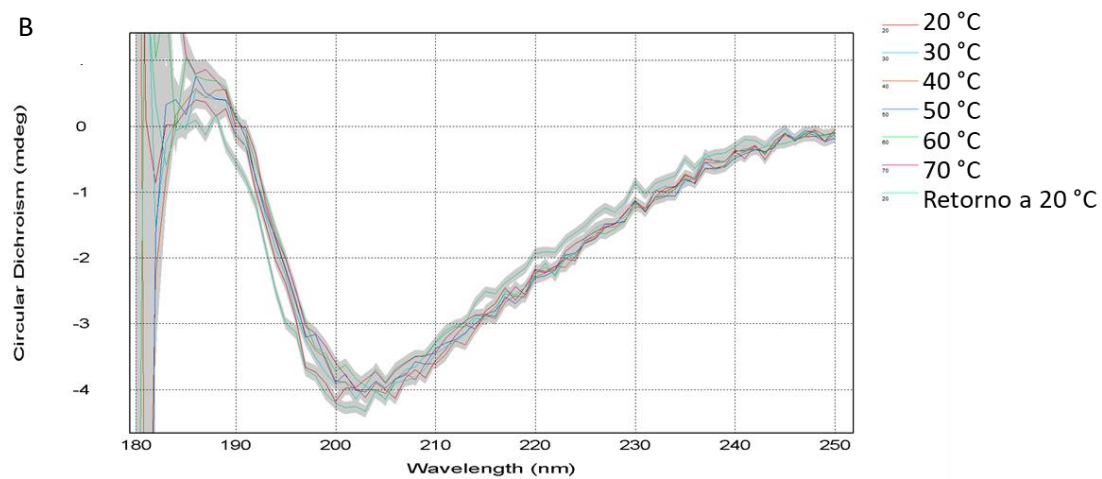


Figura 47. Espectro DC en UV lejano de la bFSH producida por *L. tarentolae*. A) Espectro adquirido en cinco medidas independientes indicadas en diferentes colores. **B)** Estabilidad térmica entre 20°C y 70°C.

4.8 Estrategias para reducir costos en la producción de bFSH en *L. tarentolae* y empleo de medios libres de componentes animales

Se exploraron diferentes estrategias con el objetivo de reducir costos y/o incrementar la pureza y seguridad biológica del producto, las cuales incluyeron: el uso de un sistema de expresión constitutivo en lugar de uno inducible para reducir el uso de antibióticos, el uso de un *tag* alternativo para poder realizar la purificación en un solo paso con la posibilidad de obtener un mejor rendimiento y pureza, y el uso de medios libres de componentes animales.

4.8.1 Generación de la línea para expresión constitutiva bFSH_His-Tag (*L. tarentolae* LOC bFSH_HisTag_pLEXSY_Hyg2)

Los sistemas de expresión constitutivos ofrecen como ventajas la eliminación del uso de un inductor (generalmente un reactivo químico) y de antibióticos requeridos para el mantenimiento de la línea celular inducible (generalmente expresan uno o más transgenes que controlan la expresión del gen de interés), lo cual a nivel industrial impacta positivamente en los costos de producción de la proteína recombinante. Como se observa en la **Figura 22**, donde se monitorea el crecimiento de la línea inducible luego de agregado el inductor, la expresión de la bFSH no afecta el crecimiento de *L. tarentolae*. Por lo tanto, se consideró oportuno expresar la proteína en un sistema constitutivo.

Se procedió al subclonado del gen quimérico (bFSH_HisTag) desde el vector inducible bFSH_HisTag_pLEXSY_IE-blecherry4 al vector pLEXSY-Hyg2 de expresión constitutiva. Para ello se digirieron los plásmidos pLEXSY_Hyg2 y bFSH_HisTag_pLEXSY_IE-blecherry4 con las enzimas de restricción *Not* I HF y *Bgl* II. Se purificaron a partir del gel de agarosa los fragmentos correspondientes al gen quimérico de aproximadamente 800 pb y al pLEXSY_Hyg2 linealizado (**Figura 48.A**). Luego de la ligación de los fragmentos con T4 ligasa y la transformación en *E. coli* se realizó el cribado mediante PCR de dos colonias (**Figura 48.B**) y se confirmó mediante secuenciación de la colonia 1 que portaba el plásmido correspondiente a bFSH_HisTag_pLEXSY_Hyg2 (ver **Anexo 8**).

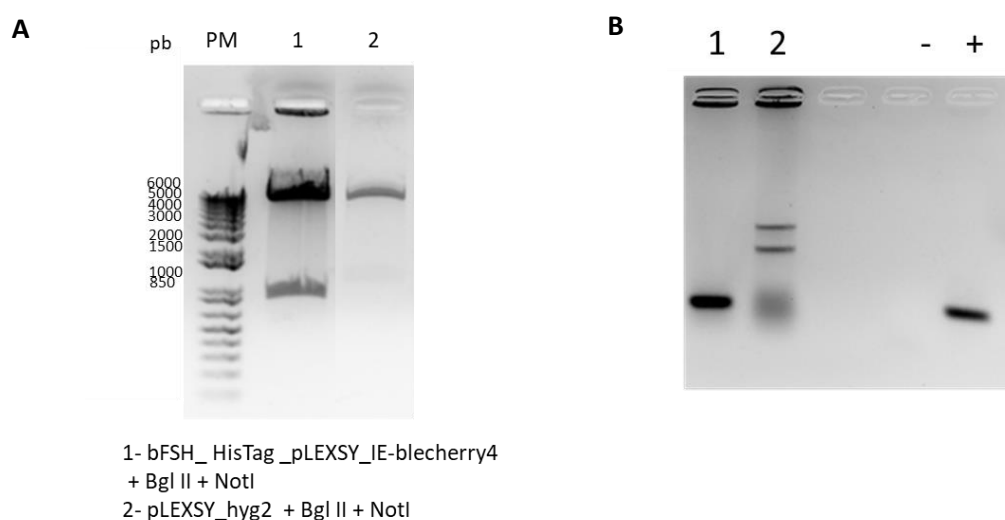


Figura 48. Generación del vector de *L. tarentolae* para expresión constitutiva de bFSH. A) Digestión de pLEXSY_Hyg2 y de bFSH_HisTag_pLEXSY_IE-blecherry4 con *Not*I y *Bgl*III. PM: 1Kb leader plus (Invitrogen). **B)** Cribado mediante PCR de colonia. Los números indican el número de

colonia, el – y + corresponden al control negativo (H₂O) y positivo (bFSH_HisTag_pLEXSY_IE-blecherry4) de amplificación.

La cepa de *L. tarentolae* LOC se transfectó con el plásmido de expresión constitutiva bFSH_HisTag_pLEXSY_Hyg2 linealizado, para favorecer así la integración dirigida en el locus cromosómico *ssu* que codifica para genes 18S ribosomales, y se seleccionaron los clones que mostraron mayor producción de bFSH evaluada mediante ELISA específico (**Figura 49**). Los siguientes estudios fueron realizados con el clon 23 por ser el mejor productor de bFSH.

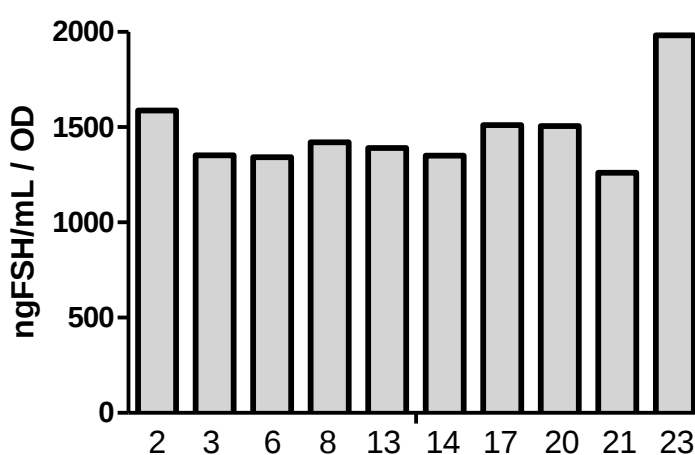


Figura 49. Producción de bFSH en sobrenadantes de clones de *L. tarentolae* LOC bFSH_HisTag_pLEXSY_Hyg2. Los ng/mL de bFSH de determinación por la técnica de ELISA, se normalizaron contra el número de células estimado por la lectura de la densidad óptica a 600 nm (OD). Los números en el eje de abscisa identifican a los clones.

Se comparó el crecimiento y producción de bFSH de la cepa inducible y constitutiva empleando cultivos estáticos. El crecimiento de ambas cepas, la inducible en presencia de inductor y la de expresión constitutiva, fue monitoreado por lectura de la OD₆₀₀ durante 72 horas de cultivo (**Figura 50.A**) y la expresión de la bFSH fue evaluada en los sobrenadantes de cultivo mediante ELISA específico (**Figura 50.B**). Como se observa en la **Figura 50**, la línea celular de expresión constitutiva alcanza en menor tiempo (48 h) una densidad celular superior (OD₆₀₀ ~ 1,3) a la línea celular de expresión inducible (OD₆₀₀ ~ 1,1 a las 72 horas). Esto seguramente se debe a que esta última está sometida a la presión de selección de antibióticos adicionales respecto del sistema constitutivo,

lo cual puede impactar el ciclo celular o la proliferación de *Leishmania*. Por otro lado, si bien el perfil de producción de bFSH es similar entre ambas líneas celulares (**Figura 50.B**), el sistema de expresión constitutivo muestra una leve tendencia a mayores niveles de la proteína recombinante respecto del sistema inducible.

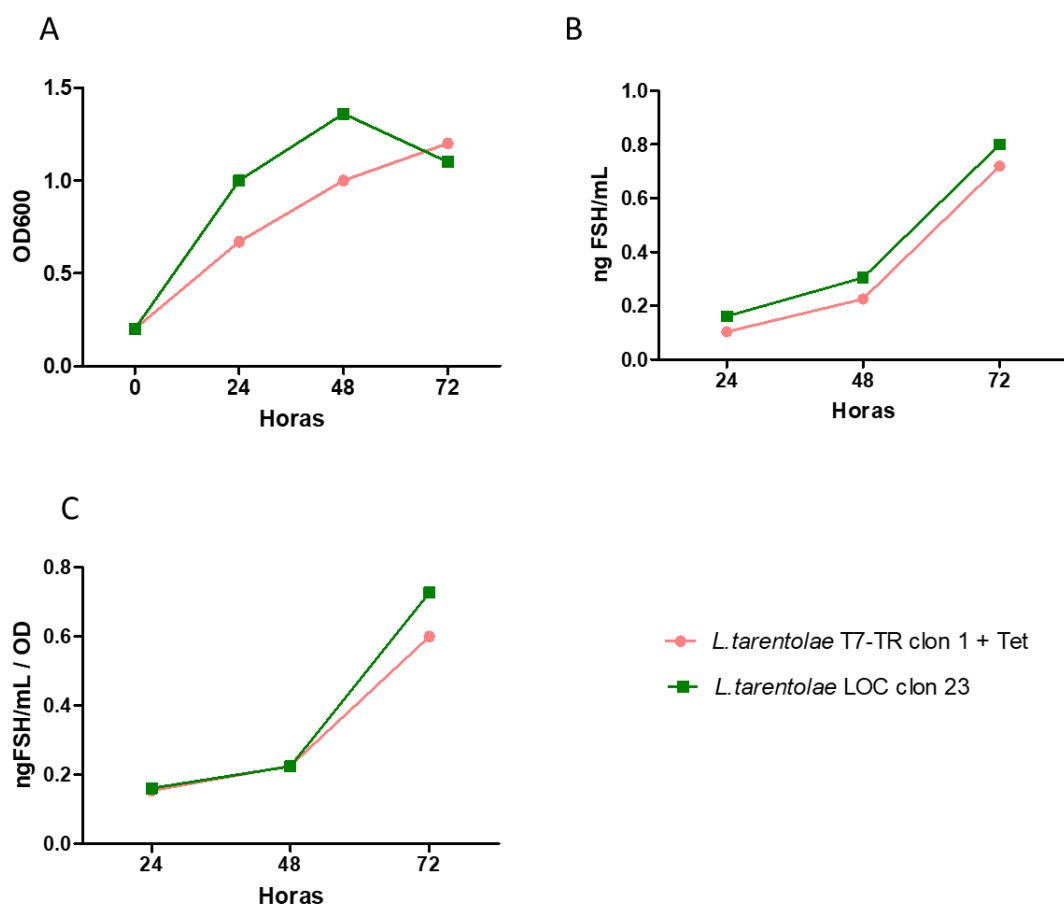


Figura 50. Comparación del sistema de expresión inducible y constitutivo de *L. tarentolae* para la producción de bFSH. A) Curva de crecimiento evaluada por lectura de la OD600. **B)** Concentración de bFSH en sobrenadante de cultivo medido por ELISA específico. **C)** ngFSH/mL corregido por la OD600.

Posteriormente se escaló la producción de bFSH por parte del clon 23 (sistema de expresión constitutivo) a matraces con un volumen de trabajo de 500 mL extendiendo el cultivo por 72 horas en agitación. En estas condiciones se obtuvo un rendimiento promedio de producción de bFSH de 2,1 mg/L de cultivo. El sobrenadante se concentró mediante filtración tangencial y se purificó mediante IMAC aplicando el lavado con 25mM de imidazol. En la **Figura 52** se observa que el perfil proteico obtenido para el producto purificado a partir de la línea celular constitutiva es muy similar al obtenido

con la línea celular inducible cuando se aplican las mismas condiciones de purificación (ver comparación con **Figura 51.B**)

Considerando que el crecimiento es comparable entre las dos líneas celulares y que la línea constitutiva tiene un rendimiento de producción de bFSH superior al de la línea inducible, la primera sería una buena alternativa para su empleo con fines productivos. Resta evaluar si la actividad biológica específica de la bFSH producida en ambos sistemas es comparable.

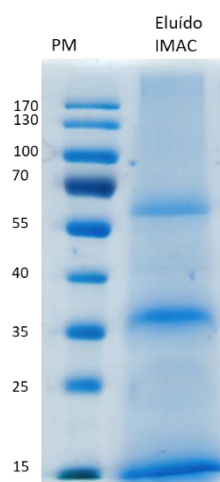


Figura 52. Purificación por IMAC de bFSH producida en la línea de *L. tarentolae* de expresión constitutiva. SDS-PAGE al 10% donde se analiza la fracción de elución que contiene a la bFSH, tinción realizada con *Coomassie blue*

4.8.2 Generación de línea inducible bFSH_2XStrep-Tag (*L. tarentolae* T7-TR bFSH_2X StrepTag_pLEXYSY_IE-blecherry4)

Con el objetivo de obtener un producto de mayor pureza y mejor rendimiento empleando un solo paso de purificación se evaluó la utilización de la etiqueta de afinidad 2X-StrepTag. La 2X-StrepTag facilita la purificación eficiente de proteínas etiquetadas que se encuentran en baja concentración en el medio, como es el caso de los sobrenadantes de medios de cultivos ¹¹³.

Con el fin de evaluar el desempeño de este sistema en *L. tarentolae* para expresar bFSH, se transfectó la línea celular T7-TR con la construcción bFSH_2X StrepTag_pLEXYSY_IE-blecherry4 sin linealizar. Se diseñó la construcción de manera que el péptido señal de

secreción preceda al 2X-StrepTag y que este estuviera sucedido por las secuencias en el siguiente orden: sitio de corte para la proteasa TEV y las subunidades β y α de la bFSH ligadas por el péptido CTP (**Figura 53**).



Figura 53. Esquema de la construcción para expresar la bFSH etiquetada al 2X-StrepTag. SP: péptido señal de secreción, Twin ST: 2X-StrepTag, TEV: sitio de corte para proteasa TEV, β -bFSH: cadena β de la bFSH, CTP: *linker* correspondiente al péptido carboxilo terminal de la hCG y α -bFSH: cadena α de la bFSH.

La selección de clones que incorporaron la construcción se llevó a cabo en membranas de nitrocelulosa sobre placas con medio semisólido en presencia del antibiótico bleomicina. Las membranas conteniendo las colonias resistentes al antibiótico se transfirieron a placas frescas con el inductor tetraciclina y se evaluó visualmente la coloración rosada correspondiente a la expresión de la proteína reportera Cherry, seleccionándose 12 clones que mostraron mayor intensidad. Estos clones se subcultivaron en medio líquido durante 48 h en presencia y ausencia de tetraciclina. En la **Figura 54.A** se muestra la expresión del gen reportero Cherry de los clones que mostraron mayores niveles de fluorescencia y en la **Figura 54.B** se cuantificó la bFSH secretada al medio de cultivo por cada clon mediante ELISA. A partir de los resultados obtenidos se seleccionó el clon 10.

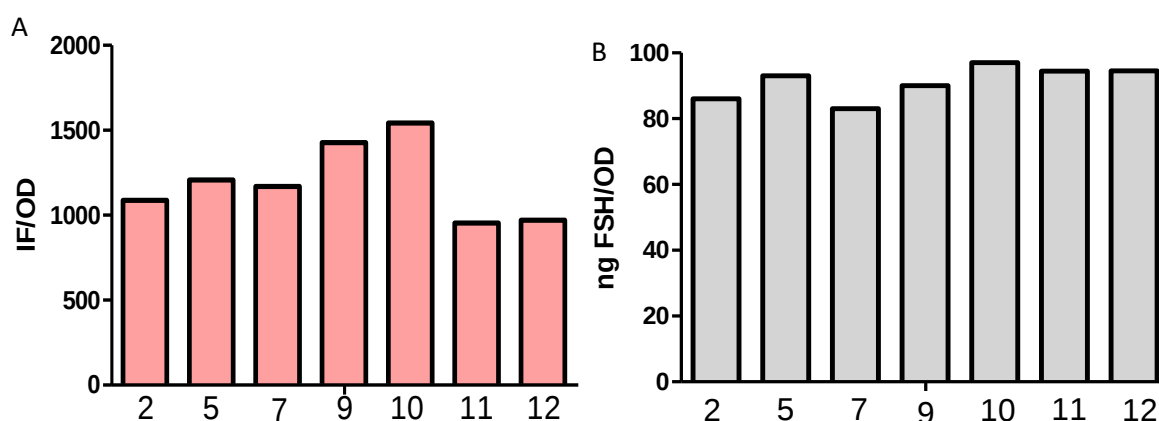


Figura 54. Evaluación de clones de *L. tarentolae* T7-TR bFSH_2X StrepTag_pLEXSY_IE-blecherry4 inducidos con tetraciclina. A) Expresión de la proteína reportera Cherry. Los números en el eje X refieren a los diferentes clones para los cuales se determinó su Intensidad de Fluorescencia (IF; λ excitación = 590 nm y λ emisión = 610 nm) normalizada contra el número de células estimado por densidad óptica a 600

nm (OD). **B)** Evaluación de la producción de bFSH utilizando ELISA específico. La masa de FSH (expresada en ng) se normalizó por el número de células estimado por densidad óptica a 600 nm (OD).

Posteriormente se escaló la producción de bFSH a partir del clon 10 a matraces con un volumen de trabajo de 500 mL en agitación con una inducción de 72 horas, obteniéndose un rendimiento promedio de producción de bFSH de 1,03 mg/L de cultivo para este sistema.

Purificación mediante cromatografía de afinidad por StrepTag.

En primer lugar, se utilizó una columna StrepTrap™ HP (GE) de 1 mL. Se sembraron 100 mL de sobrenadante clarificado (previamente incubado con bloqueador de biotina) en la columna equilibrada con PBS 1X a un flujo de 1 mL/minuto. Luego la columna fue lavada con 5 volúmenes de columna de PBS 1X y para la elución se utilizó PBS 1X con destiobiotina 2,5 mM. En estas condiciones estándares no se logró eluir la proteína, la cual quedó retenida dentro de la columna ya que el análisis cuantitativo de bFSH por la técnica de ELISA en diferentes muestras de la purificación reveló que cerca del 80% de la bFSH se logró unir a la matriz. En función de estos resultados se realizaron modificaciones para favorecer la elución de la proteína de la matriz, las cuales consistieron en aumentar la concentración de destiobiotina a 10 mM y disminuir el pH del buffer de elución a 5,5. Aún bajo estas condiciones no se logró eluir la proteína de interés.

Como estrategia adicional, se optó por emplear una columna Strep-Tactin XT (IBA) de 5 mL, la cual está diseñada especialmente para ser utilizada con proteínas con doble StrepTag. Luego de sembrar 100 mL de sobrenadante en la columna, se realizó un lavado con 100 mM Tris/HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl y 1 mM EDTA. La elución se realizó con amortiguador BXT 1X (amortiguador de lavado con 50 mM Biotina). Como se observa en la **Figura 55** se logró eluir lo cual indica que la proteína etiquetada es unida con muy alta afinidad por esta resina. Se volvieron a introducir modificaciones al protocolo de elución con el objeto de aumentar la recuperación de proteína, las cuales incluyeron: eluir con el doble de biotina (100 nM), digerir con la proteasa TEV en la columna durante toda la noche en una relación TEV:Proteína 1:50 y 1:10 y bajar el pH del buffer de elución a 6. En ninguna de las opciones mencionadas anteriormente se logró eluir la bFSH. Como

control se sembró en la columna la bFSH con HisTag y se verificó que la proteína no se adsorbe inespecíficamente a la matriz por lo que se atribuye a la fuerte unión a la misma la presencia de la etiqueta 2X-StrepTag.

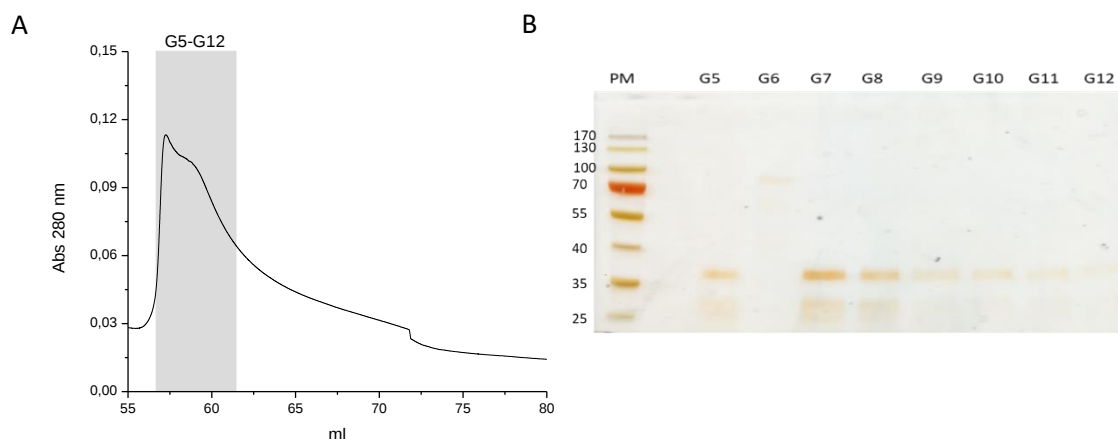


Figura 55. Purificación de bFSH-2XStrepTag utilizando matriz de Streptactin XT. A) Perfil de elución de bFSH-2XStrepTag empleando BXT 1X (50 mM Biotina). G5-G12: fracciones de elución. **B)** SDS-PAGE al 10% de las fracciones de elución, tinción con Nitrato de plata.

4.8.3 Evaluación del medio de cultivo de origen vegetal Vegitona

L. tarentolae es comúnmente cultivada en el medio de cultivo BHI, el cual es de origen animal y por lo tanto presenta riesgo de contaminación con agentes adventicios. Con el fin de disminuir el uso de sustancias de origen animal se evaluó un medio de cultivo similar, pero a base de peptonas de origen vegetal, conocido como Vegitona (Sigma). Se evaluó el crecimiento celular y los niveles de expresión de bFSH obtenidos en este medio de cultivo suplementado con hemina para la línea celular inducible de *L. tarentolae* que expresa la bFSH_HisTag. Se monitoreó el crecimiento celular mediante densidad óptica a 600 nm en los dos medios de cultivo, y no se observaron mayores diferencias entre ambos (**Figura 56.A**). Además, se evaluó si las condiciones óptimas de inducción se mantenían en el medio Vegitona mediante monitoreo de la señal de la proteína Cherry a las 24, 48 y 72 horas post-inducción (**Figura 56.B**). Teniendo en cuenta que tanto la velocidad de crecimiento como los niveles de fluorescencia de la proteína Cherry no se vieron afectados utilizando la vegitona como medio de cultivo, este podría utilizarse como sustituto del BHI. A su vez, el sobrenadante de cultivo obtenido en este medio se

purificó mediante IMAC y se analizó por SDS-PAGE (**Figura 56.C**), observándose que la bFSH presenta el mismo peso molecular aparente, por lo tanto, es probable que el perfil de glicosilación sea similar. Resta evaluar la actividad biológica de la proteína recombinante expresada en estas condiciones.

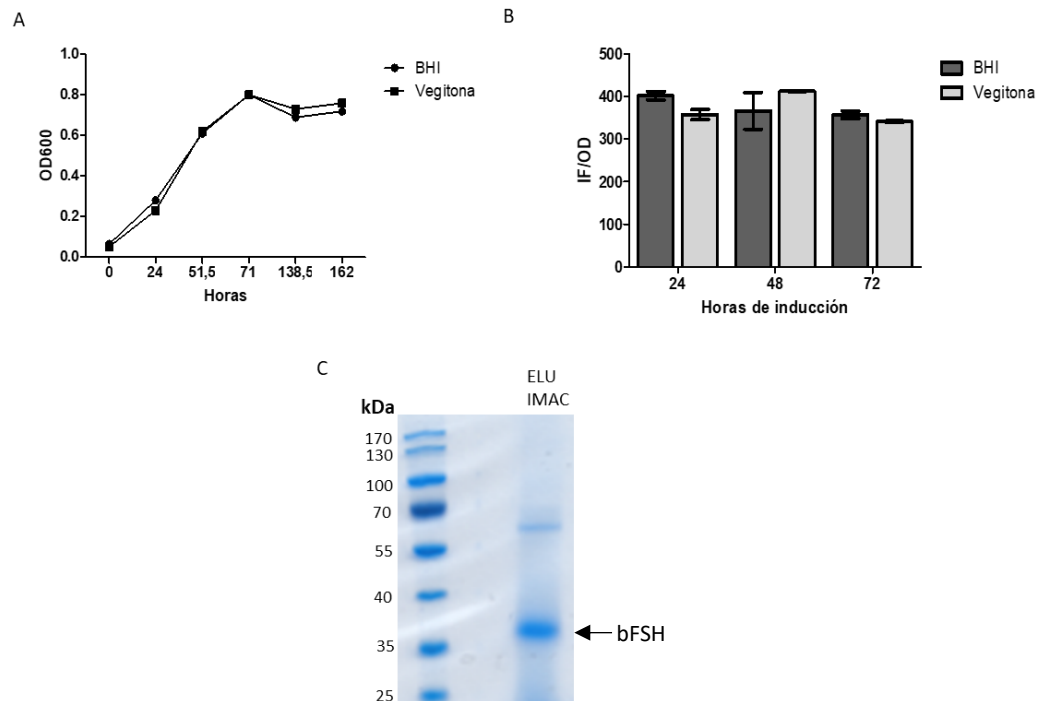


Figura 56. Curva de crecimiento, producción de proteína reportera Cherry y bFSH por *L. tarentolae* cultivada en medio BHI o Vegitona. A) Curva de crecimiento monitoreada por la medida de la densidad óptica a 600 nm. **B)** Intensidad de Fluorescencia (IF) de la proteína reportera Cherry normalizada por la densidad óptica a 600 nm. **C)** SDS-PAGE al 10% de las fracciones eluídas con 200 mM de Imidazol

5 Conclusiones y Perspectivas:

La reproducción asistida es una técnica utilizada de rutina en animales de interés productivo. Las limitaciones que presentan las preparaciones hormonales disponibles contribuyen a obtener resultados sub-óptimos y variables por lo tanto disponer de preparaciones hormonales con resultados consistentes es fundamental. En este trabajo se llevó a cabo la expresión de la bFSH utilizando *L. tarentolae* como sistema de expresión heterólogo, el cual ofrece como ventajas la simplicidad de su cultivo, la obtención de altos niveles de biomasa con el potencial de producir proteínas eucariotas con el plegamiento y modificaciones post-traduccionales adecuadas. Otro aspecto importante en la elección de *L. tarentolae* como sistema heterólogo de expresión es lo económico que resulta su cultivo (ej. componentes básicos y suplementos de medio de cultivo), lo que permite reducir los costos de producción haciendo factible la utilización de este producto recombinante en el mercado veterinario.

En primer lugar, se generó una línea celular estable de expresión inducible de bFSH con HisTag. Con el clon seleccionado de esta línea, en cultivo en agitación a escala de matraces se obtuvo un rendimiento de 1,5 mg bFSH/L de cultivo. Un aspecto importante en este trabajo fue evaluar si la producción de bFSH en este sistema era escalable empleando un biorreactor, como paso previo a una potencial aplicación industrial. Son pocos los reportes referidos al escalado de producción a nivel de biorreactor con *L. tarentolae*, por lo que se trabajó en la optimización de este proceso en un volumen de 3 L en un formato semicontinuo de cultivo. Se estudió el efecto de la suplementación con distintos nutrientes, definiéndose que el agregado de glucosa era suficiente para mantener el cultivo por 48 horas post inducción. Induciendo el cultivo a una OD600 cercana a 4 y suplementando con glucosa de forma tal de mantener su concentración por encima de 1 g/L, se obtuvo un rendimiento de 2,9 mg bFSH/L de cultivo, prácticamente duplicándose el obtenido en matraz debido al aumento de biomasa.

En cuanto a la purificación de la molécula recombinante, en primer lugar, se exploró la utilización de cromatografía de intercambio iónico empleando un intercambiador catiónico ya que este método estaba reportado para la purificación de FSH expresada en células de mamífero, luego se exploró la combinación de intercambio aniónico y catiónico. En ninguno de los casos mencionados anteriormente se logró purificar a la

proteína del resto de los contaminantes con el rendimiento deseado. Luego se utilizó cromatografía de afinidad por metales inmovilizados evaluando diferentes concentraciones de imidazol en los lavados y combinando su uso con el intercambio iónico, donde se logró disminuir la presencia del contaminante que interfiere con la actividad *in vitro* e *in vivo*. El procedimiento de purificación más exitoso en cuanto a rendimiento y actividad biológica de la bFSH fue la cromatografía de afinidad por metales inmovilizados incluyendo un lavado con 40 mM de imidazol. Con esta preparación de bFSH se realizaron ensayos de actividad biológica en ratas determinándose una actividad específica de 44,4 UI/mg.

Teniendo en cuenta que la glicosilación de la bFSH es una modificación sumamente relevante para su actividad biológica se llevó a cabo su caracterización en la molécula recombinante producida por *L. tarentolae*. Mediante espectrometría de masa se pudo determinar que los cuatro posibles sitios de N-glicosilación que presenta la bFSH se encontraban modificados y que dicha modificación era homogénea y se correspondía con una glicosilación del tipo Man3 no encontrándose complejos bi antenarios.

Un resultado relevante es que la hormona recombinante producida en *L. tarentolae* fue biológicamente activa en el ensayo aceptado por farmacopea. El próximo paso sería evaluar su potencia biológica en las especies *target*, como ovino o bovino. Para lograr este objetivo sería necesario el escalado del proceso a volúmenes mayores a los evaluados en este trabajo.

Como perspectivas se plantean estrategias para optimizar el patrón de glicosilación, aproximándose al que tiene lugar en células de mamíferos con el fin de aumentar la potencia de la hormona recombinante *in vivo*, ya sea por un incremento de su actividad o estabilidad en plasma. Una estrategia posible es el suplemento del medio de cultivo con fuentes de carbono alternativas, por ejemplo, con galactosa que se ha reportado puede estimular la incorporación de glúcidos más complejos ¹¹⁰. Otra posibilidad es modificar genéticamente a *L. tarentolae* mediante el agregado de la vía de biosíntesis del ácido siálico, la cual no está presente en este organismo y podría aumentar la estabilidad en plasma de la hormona.

Habiendo comprobado que el sistema de *L. tarentolae* es eficiente en la producción de bFSH activa, se trabajó en alternativas que permitieran reducir los costos de producción y eliminar los componentes de origen animal del medio de cultivo. En este sentido se

generó una línea de *L. tarentolae* de expresión constitutiva de bFSH con un HisTag, eliminándose la necesidad de utilizar tetraciclina como inductor, la cual fue evaluada a escala de matraz obteniéndose un rendimiento de 2,1 mg bFSH/L de cultivo. Además, se evaluó la sustitución del BHI por la Vegitona, un medio de cultivo de origen vegetal con un costo similar al BHI (BHI U\$S 22 / L, Vegitona U\$S 20 / L), como sustituto del BHI. Los resultados obtenidos mostraron que tanto el crecimiento celular como los niveles de producción de bFSH son similares en ambos medios de cultivo. Como perspectivas se plantea comprobar la actividad biológica de la bFSH producida en el medio de cultivo Vegitona. Por otra parte, se plantea evaluar distintas formulaciones del principio activo buscando aumentar su tiempo de vida media en plasma y así poder disminuir el número de dosis de la FSH necesarias para obtener el efecto biológico buscado. Esto implicaría simplificar el manejo del ganado en el campo y sería un diferencial importante con las hormonas actualmente disponibles en el mercado.

Como conclusión en este trabajo pudimos verificar la hipótesis que se planteó inicialmente, donde fue posible emplear *L.tarentolae* como sistema de expresión para producir bFSH biológicamente activa, con un buen rendimiento y costos inferiores a los sistemas de mamíferos, ya que se utilizan medios de cultivo 5 a 6 veces más económicos, no requiere el uso de CO₂ y se cultiva a temperaturas inferiores.

6 Referencias

1. Kim, H., Lee, Y., Kang, S. C., Han, B. K. & Choi, K. M. Recent vaccine technology in industrial animals. *Clin. Exp. Vaccine Res.* **5**, 12 (2016).
2. Geary, T. W., Grings, E. E., MacNeil, M. D., De Avila, D. M. & Reeves, J. J. Use of recombinant gonadotropin-releasing hormone antigens for immunosterilization of beef heifers. *J. Anim. Sci.* **84**, 343–350 (2006).
3. Liu, Y. *et al.* Immunization of dogs with recombinant GnRH-1 suppresses the development of reproductive function. *Theriogenology* **83**, 314–319 (2015).
4. Jennings, M. W. *et al.* The efficacy of recombinant equine follicle stimulating hormone (reFSH) to promote follicular growth in mares using a follicular suppression model. *Anim. Reprod. Sci.* **116**, 291–307 (2009).
5. Bó, G. A. & Mapletoft, R. J. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology* **81**, 38–48 (2014).
6. Bautista Vega, V. M., Jiménez Chávez, S. P., Meza Franco, C. D., Ramos, T. I. & Toledo, J. R. FSH in bovine superovulation. *Bionatura* **4**, (2019).
7. Ulloa-Aguirre, A., Timossi, C., Damián-Matsumura, P. & Dias, J. a. Role of glycosylation in function of follicle-stimulating hormone. *Endocrine* **11**, 205–215 (1999).
8. Gifre, L., Arís, A., Bach, À. & Garcia-Fruitós, E. Trends in recombinant protein use in animal production. *Microb. Cell Fact.* **16**, 1–17 (2017).
9. Coulibaly, S. *et al.* Expression and characterization of functional recombinant bovine follicle-stimulating hormone (boFSH α /beta) produced in the milk of transgenic rabbits. *Mol. Reprod. Dev.* **63**, 300–308 (2002).
10. Green, E. D. & Baenziger, J. U. Asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin, and thyrotropin. II. Distributions of sulfated and sialylated oligosaccharides on bovine, ovine, and human pituitary glycoprotein hormones. *J. Biol. Chem.* **263**, 36–44 (1988).
11. Ben-Menahem, D. Preparation, characterization and application of long-acting FSH analogs for assisted reproduction. *Theriogenology* **112**, 11–17 (2018).
12. Hesser, M. W., Morris, J. C. & Gibbons, J. R. Advances in Recombinant Gonadotropin Production for Use in Bovine Superovulation. *Reprod. Domest.*

- Anim.* **46**, 933–942 (2011).
13. Fauser, B. C. J. M. *et al.* Advances in recombinant DNA technology: Corifollitropin alfa, a hybrid molecule with sustained follicle-stimulating activity and reduced injection frequency. *Hum. Reprod. Update* **15**, 309–321 (2009).
 14. Adams, T. E. & Boime, I. The Expanding Role of Recombinant Gonadotropins in Assisted Reproduction. *Reprod. Domest. Anim.* **43**, 186–192 (2008).
 15. Fox, K. M., Dias, J. A. & Roey, P. Van. Three-Dimensional Structure of Human Follicle-Stimulating Hormone. **15**, 378–389 (2001).
 16. Dalpathado, D. glycomics of the glycoprotein follicle stimulating hormone: G. analysis of isolates from two mammalian species S. *et al.* Comparative glycomics of the glycoprotein follicle stimulating hormone: Glycopeptide analysis of isolates from two mammalian species. *Biochemistry* **45**, 8665–8673 (2006).
 17. Prakash, B. S., Wallenhorst, S., Metten, M., Holtz, W. & Wuttke, W. Development of a sensitive enzymeimmunoassay (EIA) for FSH determination in bovine plasma. *Anim. Reprod. Sci.* **55**, 183–192 (1999).
 18. Durán-Pastén, M. L. & Fiordeliso, T. GnRH-induced Ca²⁺ signaling patterns and gonadotropin secretion in pituitary gonadotrophs. Functional adaptations to both ordinary and extraordinary physiological demands. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **4**, 1–13 (2013).
 19. Hunzicker-Dunn, M. & Schwartz, N. *Follicle Stimulating Hormone: Regulation of Secretion and Molecular Mechanisms of Action*. (1990).
 20. Fan, Q. R. & Hendrickson, W. a. Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. *Nat. Publ. Gr.* **433**, 269–277 (2005).
 21. Nataraja, S. G., Yu, H. N. & Palmer, S. S. Discovery and Development of Small Molecule Allosteric Modulators of Glycoprotein Hormone Receptors. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **6**, (2015).
 22. Zhang, Y. *et al.* Development and characterization of a novel long-acting recombinant follicle stimulating hormone agonist by fusing Fc to an FSH- b subunit. **31**, 169–182 (2016).
 23. Moore, S. G. & Hasler, J. F. A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. *J. Dairy Sci.* **100**, 10314–10331 (2017).

24. Carvalho, P. D. *et al.* Use of a single injection of long-acting recombinant bovine FSH to superovulate Holstein heifers: A preliminary study. *Theriogenology* **82**, 481–489 (2014).
25. Mikkola, M. *Superovulation and embryo transfer in dairy cattle : effect of management factors with emphasis on sex-sorted semen.* (2017).
26. Tríbulo, A. *et al.* Superstimulation of ovarian follicular development in beef cattle with a single intramuscular injection of Folltropin-V. *Anim. Reprod. Sci.* **129**, 7–13 (2011).
27. Callejas, S. S. *et al.* El uso combinado de dosis reducidas de FSH-P y de eCG como tratamiento superovulatorio en bovinos. *Rev. Argentina Prod. Anim.* **276**, 63–73 (2005).
28. Wilson, J. M., Jones, A. L., Moore, K. & Looney, C. R. Superovulation of cattle with a recombinant- D N A bovine follicle stimulating hormone. **33**, 71–82 (1993).
29. Mapletoft, R. J. & Bó, G. A. The evolution of improved and simplified superovulation protocols in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* **24**, 278–283 (2012).
30. Kanitz W, Becker F, Schneider F, Kanitz E, Leiding C, Nohner HP, P. R. Superovulation in cattle: practical aspects of gonadotropin treatment and insemination Wilhelm. *J. Dairy Res.* **46**, 77–85 (2006).
31. Blondeel EJ, Braasch K, McGill T, Chang D, Engel C, Spearman M, Butler M, A. M. Tuning a MAb glycan profile in cell culture: Supplementing N-acetylglucosamine to favour G0 glycans without compromising productivity and cell growth. *J. Biotechnol.* **214**, 105–112 (2015).
32. Weidong *et al.* Expression of bovine follicle-stimulating hormone subunits in a Hansenula polymorpha expression system increases the secretion and bioactivity in vivo. *Protein Expr. Purif.* **68**, 183–189 (2009).
33. Fidler, A. E. *et al.* Production of biologically active tethered ovine FSH by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. 213–225 (1995).
34. Wiel, D. F. M. Van De, Rijn, P. A. Van & Meloen, R. H. High-level expression of biologically active recombinant bovine follicle stimulating hormone in a baculovirus system. 83–98 (1998).
35. Dirnberger, D., Steinkellner, H., Abdennebi, L., Remy, J. & Wiel, D. Van De.

- Secretion of biologically active glycoforms of bovine follicle stimulating hormone in plants. **4579**, 4570–4579 (2001).
36. Greenberg NM, Anderson JW, Hsueh AJ, Nishimori K, Reeves JJ, deAvila DM, Ward DN, R. J. Expression of biologically active heterodimeric bovine follicle-stimulating hormone in milk of transgenic mice. **88**, 8327–8331 (1991).
 37. Gutiérrez-Reinoso, M. A. *et al.* Effects of Extra-Long-Acting Recombinant Bovine FSH (bscrFSH) on Cattle Superovulation. *Anim.* **12**, (2022).
 38. Sanchez Ramos, O (2019) Recombinant bovine follicle-stimulating hormone, composition comprising the same, and method to induce superovulation and estrus synchronization in bovines using said hormone (Patente de Brasil. Número EP19733942.7A). Centro De Biotecnología Y Biomedicina Spa, Fundação Edson Queiroz - Universidad De Fortaleza
 39. Sanderson, N. & Martinez, M. A single administration of a long-acting recombinant ovine FSH (roFSH) for cattle superovulation. *Theriogenology* **154**, 66–72 (2020).
 40. Lai, J. Y., Klatt, S. & Lim, T. S. Potential application of *Leishmania tarentolae* as an alternative platform for antibody expression. *Crit. Rev. Biotechnol.* **39**, 380–394 (2019).
 41. Ulloa-Aguirre, A., Maldonado, A., Damián-Matsumura, P. & Timossi, C. Endocrine regulation of gonadotropin glycosylation. *Arch. Med. Res.* **32**, 520–532 (2001).
 42. Borromeo, V. *et al.* Characterization of biologically active bovine pituitary FSH purified by immunoaffinity chromatography using a monoclonal antibody. *Gen. Comp. Endocrinol.* **139**, 179–189 (2004).
 43. Ulloa-Aguirre, a. Impact of Carbohydrate Heterogeneity in Function of Follicle-Stimulating Hormone: Studies Derived from in Vitro and in Vivo Models. *Biol. Reprod.* **69**, 379–389 (2003).
 44. Galway, a. B. *et al.* In vitro and in vivo bioactivity of recombinant human follicle-stimulating hormone and partially deglycosylated variants secreted by transfected eukaryotic cell lines. *Endocrinology* **127**, 93–100 (1990).
 45. Arey, B. J. *et al.* Induction of promiscuous G protein coupling of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor: a novel mechanism for transducing

- pleiotropic actions of FSH isoforms. *Mol. Endocrinol.* **11**, 517–26 (1997).
46. Bousfield, G. R. *et al.* All-or-none N-glycosylation in primate follicle-stimulating hormone β -subunits. *Mol. Cell. Endocrinol.* **260–262**, 40–48 (2007).
 47. Kimura, K. *et al.* Successful superovulation of cattle by a single administration of FSH in aluminum hydroxide gel. *Theriogenology* **68**, 633–639 (2007).
 48. KIMURA, K. Superovulation with a single administration of FSH in aluminum hydroxide gel: a novel superovulation method for cattle. *J. Reprod. Dev.* **62**, 423–429 (2016).
 49. Low, S. C., Nunes, S. L., Bitonti, A. J. & Dumont, J. A. Oral and pulmonary delivery of FSH – Fc fusion proteins via neonatal Fc receptor-mediated transcytosis. **20**, 1805–1813 (2005).
 50. STEELMAN, S. L. & POHLEY, F. M. Assay of the follicle stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* **53**, 604–616 (1953).
 51. Rohde, J. *et al.* Development of a New Cell-Based Assay for the Determination of FSH Activity Development of a New Cell-Based Assay for the Determination of FSH Activity. *Altex Proc.* 89–99 (2011).
 52. Christin-Maitre, S., Vasseur, C., Fauser, B. & Bouchard, P. Bioassays of gonadotropins. *Methods* **21**, 51–57 (2000).
 53. Niimi, T. Advanced Technologies for Protein Complex Production and Characterization. in *Advanced Technologies for Protein Complex Production and Characterization* vol. 896 155–165 (2016).
 54. Klatt, S., Simpson, L., Maslov, D. A. & Konthur, Z. *Leishmania tarentolae*: Taxonomic classification and its application as a promising biotechnological expression host. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **13**, e0007424 (2019).
 55. Niimi, T. Recombinant Protein Production in the Eukaryotic Protozoan Parasite *Leishmania tarentolae* : A Review. *Recomb. Gene Expr.* **824**, 307–315 (2004).
 56. Akram, J., Mojgan, B. & Bahram, K. Compound serum and hemin free medium for cultivation of *Leishmania tarentolae* : A recombinant protein expression system. **14**, 2130–2134 (2015).
 57. Fritsche, C., Sitz, M., Weiland, N., Breitling, R. & Pohl, H. Characterization of the growth behavior of *Leishmania tarentolae* – a new expression system for

- recombinant proteins. 384–393 (2007) doi:10.1002/jobm.200710111.
58. Bañuls, A. L., Hide, M. & Prugnolle, F. Leishmania and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. *Adv. Parasitol.* **64**, (2007).
 59. Taheri, T., Seyed, N., Mizbani, A. & Rafati, S. Leishmania-based expression systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 7377–7385 (2016).
 60. Oppendoes, F. R. & Coombs, G. H. Metabolism of Leishmania: proven and predicted. *Trends Parasitol.* **23**, 149–158 (2007).
 61. Pan, A. A. *et al.* Developmental life cycle of Leishmania--cultivation and characterization of cultured extracellular amastigotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* **40**, 213–223 (1993).
 62. Saunders, E. C. *et al.* Isotopomer profiling of Leishmania mexicana promastigotes reveals important roles for succinate fermentation and aspartate uptake in tricarboxylic acid cycle (TCA) anaplerosis, glutamate synthesis, and growth. *J. Biol. Chem.* **286**, 27706–27717 (2011).
 63. Van Hellemond, J. J. & Tielens, A. G. Inhibition of the respiratory chain results in a reversible metabolic arrest in Leishmania promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **85**, 135–138 (1997).
 64. McConville, M. J., Saunders, E. C., Kloehn, J. & Dagley, M. J. Leishmania carbon metabolism in the macrophage phagolysosome- feast or famine? *F1000Research* **4**, 938 (2015).
 65. Niu, Q., Li, S., Chen, D., Chen, Q. & Chen, J. Iron acquisition in Leishmania and its crucial role in infection. *Parasitology* **143**, 1347–1357 (2016).
 66. Pineda, T. *et al.* A non-commercial approach for the generation of transgenic Leishmania tarentolae and its application in antileishmanial drug discovery. *Parasitology* **143**, 1133–1142 (2016).
 67. Klatt, S., Hartl, D., Fauler, B. & Gagoski, D. Generation and Characterization of a Leishmania tarentolae Strain for Site-Directed in Vivo Biotinylation of Recombinant Proteins. (2013).
 68. Sugino, M. & Niimi, T. Chapter 16 Expression of Multisubunit Proteins in Leishmania tarentolae. **824**, 317–325.
 69. Hartmann, M. & Breitling, R. Suspension Culture of Protozoan Organisms. 294–

346.

70. Kushnir, S., Gase, K., Breitling, R. & Alexandrov, K. Development of an inducible protein expression system based on the protozoan host *Leishmania tarentolae*. **42**, 37–46 (2005).
71. Breitling, R. *et al.* Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production. **25**, 209–218 (2002).
72. Jones, J. D. *Leishmania tarentolae*: an alternative approach to the production of monoclonal antibodies to treat emerging viral infections. *Infect. Dis. poverty* **4**, 1–5 (2015).
73. Basile, G. & Peticca, A. M. Recombinant Protein Expression in *Leishmania tarentolae*. *Mol Biotechnol* **43**, 273–278 (2009).
74. Maria Jose Ferrer, Diana Patricia Wehrendt, Mariana Bonilla, Marcelo Alberto Comini, Maria Teresa Tellez-Iñon, and M. P. Production of Recombinant *Trypanosoma cruzi* Antigens in *Leishmania tarentolae*. 1–10 (2018) doi:10.1017/S1751731118003233.
75. Fritsche, C., Sitz, M., Weiland, N., Breitling, R. & Pohl, H. D. Characterization of the growth behavior of *Leishmania tarentolae* - A new expression system for recombinant proteins. *J. Basic Microbiol.* **47**, 384–393 (2007).
76. Khan, A. H. & Noordin, R. Strategies for humanizing glycosylation pathways and producing recombinant glycoproteins in microbial expression systems. *Biotechnol. Prog.* **35**, (2019).
77. Klatt S., Rohe M., Alagesan K, Kolarich D, K. Z. and H. D. J. Production of Glycosylated Soluble Amyloid Precursor Protein Alpha (sAPPalpha) in *Leishmania tarentolae*. *J. Proteome Res.* **12**, 396–403 (2013).
78. Bioscience, J. LEXSY brochure.
79. Hartmann, M. & Breitling, R. Suspension Culture of Protozoan Organisms. in *Industrial Scale Suspension Culture of Living Cells* (eds. Meyer, H.-P. & Schmidhalter, D. R.) 40–93 (Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2014).
80. Lai, J. Y., Klatt, S. & Lim, T. S. Potential application of *Leishmania tarentolae* as an alternative platform for antibody expression. *Crit. Rev. Biotechnol.* **39**, 380–394 (2019).
81. Lai, J. Y., Klatt, S. & Lim, T. S. Potential application of *Leishmania tarentolae* as an

- alternative platform for antibody expression. *Crit. Rev. Biotechnol.* **0**, 1–15 (2019).
82. Bioscience, J. Eukaryotic Protein Expression. *Bioscience*.
 83. Jena Bioscience. Manual LEXSinduce4 Expression Kit For inducible expression of recombinant proteins in *Leishmania tarentolae*. *Ifta Ag* **4**, (2015).
 84. Biology, S., Gazdag, E. M., Cirstea, I. C. & Lukes, J. Purification and crystallization of human Cu / Zn superoxide dismutase recombinantly produced in the protozoan *Leishmania tarentolae*. 871–877 (2010) doi:10.1107/S1744309110019330.
 85. Hemayatkar, M., Mahboudi, F., Majidzadeh-a, K., Davami, F. & Vaziri, B. Increased expression of recombinant human tissue plasminogen activator in *Leishmania tarentolae*. 1198–1206 (2010) doi:10.1002/biot.201000233.
 86. Mirzaahmadi, S. *et al.* Expression of recombinant human coagulation factor VII by the lizard *Leishmania* expression system. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, (2011).
 87. Davoudi, N., Hemmati, A., Khodayari, Z., Adeli, A. & Hemayatkar, M. Cloning and expression of human IFN- γ in *Leishmania tarentolae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 1893–1899 (2011).
 88. Klatt, S. & Konthur, Z. Secretory signal peptide modification for optimized antibody-fragment expression-secretion in *Leishmania tarentolae*. *Microb. Cell Fact.* **11**, 1–10 (2012).
 89. Taromchi, A. H., Kazemi, B., Mahmazi, S. & Bandehpour, M. Heterologous expression of human IL-29 (IFN- λ 1) in Iranian Lizard leishmania. *Iran. J. Biotechnol.* **11**, 168–174 (2013).
 90. Jørgensen, M. L. *et al.* Expression of single-chain variable fragments fused with the Fc-region of rabbit IgG in *Leishmania tarentolae*. 1–9 (2014).
 91. Mlynarcik, P. *et al.* Deciphering the interface between a CD40 receptor and borrelial ligand OspA. *Microbiol. Res.* **170**, 51–60 (2015).
 92. Yadegari, Z., Bandehpour, M., Kazemi, B. & Sharifi-Sarasiabi, K. Expression of recombinant human amelogenin in Iranian lizard *Leishmania* and its biological function assay. *Iran. J. Public Health* **44**, 987–996 (2015).
 93. Taslimi, Y. *et al.* Antitumor effect of IP-10 by using two different approaches: Live delivery system and gene therapy. *J. Breast Cancer* **19**, 34–44 (2016).

94. Basak, A., Shervani, N. J., Mbikay, M. & Kolajova, M. Recombinant proprotein convertase 4 (PC4) from *Leishmania tarentolae* expression system: Purification, biochemical study and inhibitor design. *Protein Expr. Purif.* **60**, 117–126 (2008).
95. Phan, H., Sugino, M. & Niimi, T. The production of recombinant human laminin-332 in a *Leishmania tarentolae* expression system. *Protein Expr. Purif.* **68**, 79–84 (2009).
96. Ben-abdallah, M. *et al.* Production of soluble , active acetyl serotonin methyl transferase in *Leishmania tarentolae*. *Protein Expr. Purif.* **75**, 114–118 (2011).
97. FAO. Animal Production and Health Division (NSA). 2014
http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/animal_production.html.
98. Albanese, C., Christin-maitre, S., Sluss, P. M., Crowley, W. F. & Jameson, J. L. Development of a bioassay for FSH using a recombinant human FSH receptor and a CAMP responsive luciferase reporter gene. **7207**, 211–219 (1994).
99. Rommerts, F. F. G. Application of a CHO cell line transfected with the human FSH receptor for the measurement of specific FSH receptor activation inhibitors in human serum. (1996).
100. Mastrangeli, R. *et al.* In-vivo biological activity and glycosylation analysis of a biosimilar recombinant human follicle-stimulating hormone product (Bemfola) compared with its reference medicinal product (GONAL-f). *PLoS One* **12**, 1–15 (2017).
101. Cooke, D. J., Crowe, M. A., Roche, J. F. & Headon, D. R. Gonadotrophin heterogeneity and its role in farm animal reproduction. *Anim. Reprod. Sci.* **41**, 77–99 (1996).
102. Pierce, J. G. & Parsons, T. F. Glycoprotein Hormones: Structure and Function. *Annu. Rev. Biochem.* **50**, 465–495 (1981).
103. CaymanChem. Cyclic AMP Elisa Kit.
<https://www.caymanchem.com/pdfs/581001.pdf>.
104. Kushnir, S. *et al.* Artificial linear episome-based protein expression system for protozoon *Leishmania tarentolae*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **176**, 69–79 (2011).
105. Routledge, S. J. Beyond de-foaming: The effects of antifoams on bioprocess productivity. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **3**, e201210001 (2012).
106. Fritsche, C., Sitz, M., Wolf, M. & Pohl, H. D. Development of a defined medium

- for heterologous expression in *Leishmania tarentolae*. *J. Basic Microbiol.* **48**, 488–495 (2008).
107. Medzihradszky, K. F. Characterization of protein N-glycosylation. *Methods Enzymol.* **405**, 116–138 (2006).
 108. Grzyb, K. *et al.* Immunogenicity and functional characterization of Leishmania-derived hepatitis C virus envelope glycoprotein complex. *Sci. Rep.* **6**, 1–11 (2016).
 109. Blondeel, E. J. M. & Aucoin, M. G. Supplementing glycosylation: A review of applying nucleotide-sugar precursors to growth medium to affect therapeutic recombinant protein glycoform distributions. *Biotechnol. Adv.* **36**, 1505–1523 (2018).
 110. Naik, H. M., Majewska, N. I. & Betenbaugh, M. J. Impact of nucleotide sugar metabolism on protein N-glycosylation in Chinese Hamster Ovary (CHO) cell culture. *Curr. Opin. Chem. Eng.* **22**, 167–176 (2018).
 111. Kelly, S. M., Jess, T. J. & Price, N. C. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1751**, 119–139 (2005).
 112. Haj Hassan, M. *et al.* Differential thermal stability of human, bovine and ovine Follicle-Stimulating Hormone (FSH) and Luteinizing Hormone (LH) quaternary structures. *Gen. Comp. Endocrinol.* **212**, 124–130 (2015).
 113. Schmidt, T. G. M. *et al.* Development of the Twin-Strep-tag® and its application for purification of recombinant proteins from cell culture supernatants. *Protein Expr. Purif.* **92**, 54–61 (2013).

7 Anexos

Anexo 1

Secuencia codificante bFSH_HisTag *L. tarentolae*

ATGACCAGCCGCCTGGTGCGCGTGCTGGCGGCGGCAATGCTGGTGGCGGCGGCAGTGAGCG
TGGCCATGGCGCACCACCACCACCACCACCGCAGCTGCGAGCTGACGAACATCACGATCACG
GTGGAGAAGGAAGAGTGCGGCTTCTGCATCAGCATCAACACGACCTGGTGCGCCGGCTACTG
CTACACCCGCGACCTGGTGTACCGCGACCCGGCCCGCCGAACATCCAGAAGACGTGCACGTT
CAAGGAGCTGGTGTACGAGACGGTGAAGGTGCCGGGCTGCGCCACCACGCGGACAGCCTG
TACACGTACCCGGTGGCGACGGAGTGCCACTGCAGCAAGTGCAGACAGCGACAGCACCGACTG
CACCGTGCGCGGCCTGGGCCCCGAGCTACTGCAGCTTCCGCGAGATCAAGGAGAGCAGCAGCA
GCAAGGCGCCGCCGCAAGCCTGCCGAGCCCGAGCCGCCTGCCGGGCCCGAGCGACACCCCG
ATCCTGCCGCGAGTTCCCGGACGGCGAGTTCACGATGCAGGGCTGCCCGGAGTGCAAGCTGAA
GGAGAACAAGTACTTCAGCAAGCCGACGCGCCGATCTACAGTGCATGGGCTGCTGCTTCA
GCCGCGCCTACCCGACCCCGGCCCGCAGCAAGAAGACGATGCTGGTGCCGAAGAACATCACC
AGCGAGGCCACGTGCTGCGTGGCCAAGGCCTTACGAAGGCCACGGTGATGGGCAACGTGC
GCGTGGAGAACCACACCGAGTGCCACTGCTCCACGTGCTACTACCACAAGAGCTAG

*péptido señal

Secuencia de aminoácidos bFSH_HisTag *L. tarentolae*

MTSRLVRVLAAAMLVAAAVSVAMAHHHHHHRSCELT**NIT**ITVEKEECGFCIS**INTT**WCAGYCYTR
DLVYRDPARPNIQKTCTFKELVYETVKVPGCAHHADSLYTPVATECHCSKCDSDSTDCTVRGLGP
SYCSFREIKESSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQFPDGEFTMQGCPECKLKENKYFSKPDAPYQ
CMGCCFSRAYPTPARSKTMLVPK**NIT**SEATCCVAKAFTKATVMGNVRVE**NHT**ECHCSTCYHHKS
*

-En gris se señalan los potenciales sitios de N-glicosilación

Secuencia codificante bFSH_2XStrepTag *L. tarentolae*

ATGACCAGCCGCCTGGTGCGCGTGCTGGCGGCGGCAATGCTGGTGGCGGCGGCAGTGAGCG
TGGCCATGGCGCGCAGCAGCGGCTGGAGCCACCCGCAGTTCGAGAAGGGCGGCGGCAGCGG
CGGCGGCAGCGGCGGCGGCTCCTGGTCCCACCCCGAGTTCGAGAAGAGCGGCAGCGAGAAC
CTGTACTTCCAGGGCAGCCGCAGCTGCGAGCTGACGAACATCACGATCACGGTGGAGAAGGA
AGAGTGC GGCTTCTGCATCAGCATCAACACGACCTGGTGCGCCGGCTACTGCTACACCCGCGA
CCTGGTGTACCGCGACCCGGCCCGCCGAACATCCAGAAGACGTGCACGTTCAAGGAGCTGG
TGACGAGACGGTGAAGGTGCCGGGCTGCGCCACCACGCGGACAGCCTGTACACGTACCCG
GTGGCGACGGAGTGCCACTGCAGCAAGTGCAGACAGCGACAGCACCGACTGCACCGTGCGCG
GCCTGGGCCCCGAGCTACTGCAGCTTCCGCGAGATCAAGGAGAGCAGCAGCAGCAAGGCGCC
GCCGCAAGCCTGCCGAGCCCGAGCCGCCTGCCGGGCCCGAGCGACACCCCGATCCTGCCGC
AGTTCCCGGACGGCGAGTTCACGATGCAGGGCTGCCCGGAGTGCAAGCTGAAGGAGAACAA
GTACTTCAGCAAGCCGGACGCGCCGATCTACAGTGCATGGGCTGCTGCTTCAGCCGCGCCTA
CCCGACCCCGGCCCGCAGCAAGAAGACGATGCTGGTGCCGAAGAACATCACCAGCGAGGCCA

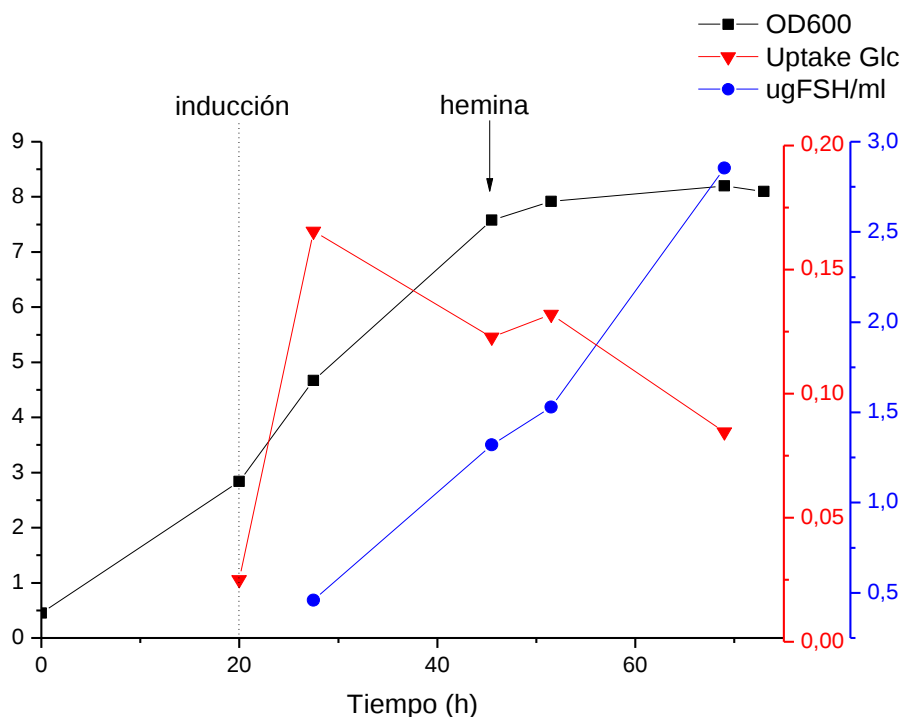
CGTGCTGCGTGGCCAAGGCCTTCACGAAGGCCACGGTGATGGGCAACGTGCGCGTGGAGAA
CCACACCGAGTGCCACTGCTCCACGTGCTACTACCACAAGAGCTAG

Secuencia de aminoácidos bFSH_2XStrepTag *L. tarentolae*

MTSRLVRVLAAMLVAAAVSVAMARSSGWSHPQFEKGGSGGGSGGGSWSHQPFEKSGSENL
YFQGSRSCELTNITITVEKEECGFCISINTTWCAGYCYTRDLVYRDPARPNIQKTCTFKELVYETVKVP
GCAHHADSLYTPVATECHCSKCDSDSTDCTVRGLGPSYCSFREIKESSSSKAPPPSLPSPRLPGPS
DTPILPQFPDGEFTMQGCPECKLKENKYFSKPDAPYQCMGCCFSRAYPTPARSKKTMVLVPKNITS
EATCCVAKAFTKATVMGNVRVENHTEHCSTCYHKS*

Anexo 2

Lote 3 de producción en Biorreactor



Cultivo de *L. tarentolae* productora de bFSH en biorreactor, lote 3. Se monitoreó el crecimiento celular mediante OD600, el consumo de glucosa (Uptake Glc) y la producción de bFSH por ELISA. La flecha indica el momento en que se suplementó con Hemina.

Anexo 3

Resultado de Espectrometría de masas de la bFSH reducida y alquilada en condiciones estándar.

Muestra: **bFSH**

Placa: **Julio 2017**

Posición: **J19**

(seleccionar imagen y aumentar el zoom para ver la imagen correctamente)



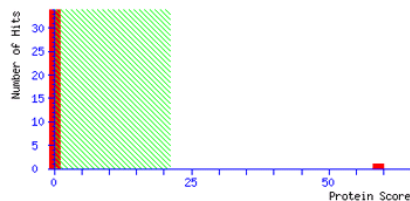
114

Resultado del análisis utilizando el motor de búsqueda Mascot

(www.matrixscience.com)

Mascot Score Histogram

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
Individual ions scores > 21 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).
Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Peptide Summary Report

Format As: Peptide Summary [Help](#)

Significance threshold $p < 0.05$ Max. number of hits 20

Standard scoring ☐ MudPIT scoring ☒ Ions score or expect cut-off 0 Show sub-sets 0

Show pop-ups ☒ Suppress pop-ups ☐ Sort unassigned Decreasing Score Require bold red ☐

☐ Error tolerant

1. [KarinGrumberg_FSH](#) Mass: 29284 Score: 59 Matches: 4(3) Sequences: 4(3)
☐ Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
☒ 3	775.4052	774.3979	774.4024	-0.0045	0	38	0.002	1	U	R.AYTPAR.S
☒ 26	1038.5634	1037.5561	1037.5618	-0.0056	0	14	0.19	1	U	R.DPARPNIQK.T
☒ 34	1157.5425	1156.5352	1156.5335	0.0017	0	37	0.001	1	U	R.GLGPSYCSFR.E + Propionamide (C)
☒ 66	1684.9091	1683.9018	1683.9056	-0.0038	1	25	0.019	1	U	R.DLVYRDPARPNIQK.T

Protein View

Match to: [KarinGrumberg_FSH](#) Score: 134 Expect: $2.4e-010$

Nominal mass (M_r): 29284; Calculated pI value: 8.29

NCBI BLAST search of [KarinGrumberg_FSH](#) against nr
Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Variable modifications: Oxidation (M), Dehydro (C), Propionamide (C)
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Sequence Coverage: 24%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```
1 MTSRLRVLA AAMLVAAVS VMAHHHHHH RSELTNITI TVEKEECGFC
51 ISINTTWCAG YCYTRDLVYR DPARPNIQKT CTFKELVYET VKVPGCAHHA
101 DSLYTPVPAT ECHCSKCDSD STDCTVRGLG PSYCSFREIK ESSSKAPPP
151 SLPSPSRLPG PSDTPILPQF PDGEFTMQGC PECKLKENKY FSKPDAPIYQ
201 CMGCCFSRAY PTPARSKTM LVPKHITSEA TCCVAKAFK ATVMGNVRVE
251 NHTEHCSTC YYHKS
```

Sort Peptides By ☒ Residue Number ☐ Increasing Mass ☐ Decreasing Mass

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
66 - 79	1684.9091	1683.9018	1683.9056	-0.0038	1	R.DLVYRDPARPNIQK.T (Ions score 25)
71 - 79	1038.5634	1037.5561	1037.5618	-0.0056	0	R.DPARPNIQK.T (Ions score 14)
85 - 92	980.5270	979.5197	979.5226	-0.0029	0	K.ELVYETVK.V (No match)
128 - 137	1157.5425	1156.5352	1156.5335	0.0017	0	R.GLGPSYCSFR.E Propionamide (C) (Ions score 37)
209 - 215	775.4052	774.3979	774.4024	-0.0045	0	R.AYTPAR.S (Ions score 38)
218 - 224	832.4819	831.4746	831.4888	-0.0142	1	K.KTMLVPK.N Oxidation (M) (No match)
225 - 236	1381.6619	1380.6546	1380.6377	0.0169	0	K.NITSEATCCVAK.A 2 Propionamide (C) (No match)
241 - 248	847.4393	846.4320	846.4382	-0.0061	0	K.ATVMGNVR.V (No match)
241 - 248	863.4346	862.4273	862.4331	-0.0058	0	K.ATVMGNVR.V Oxidation (M) (No match)

Link “protein summary report”:

http://ubypa8/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20170823/F011463.dat&REPORT=protein&sigthreshold=0.05&REPORT=20&server_mudpit_switch=0.000000001&ignoreionsscorebelow=0&showsubsets=0&showpopups=TRUE&sortunassigned=scoredown&requireboldred=0

Link “protein view”:

http://ubypa8/mascot/cgi/protein_view.pl?file=../data/20170823/F011463.dat&hit=1

Conclusión:

- En esta muestra se identifica de manera estadísticamente significativa la siguiente proteína:
 - “bFSH con una cobertura de secuencia del 24%.”

Anexo 4

Resultado de Espectrometría de masas de la bFSH reducida eligiendo con DTT 55 mM y la alquilación con IAM 275 mM.

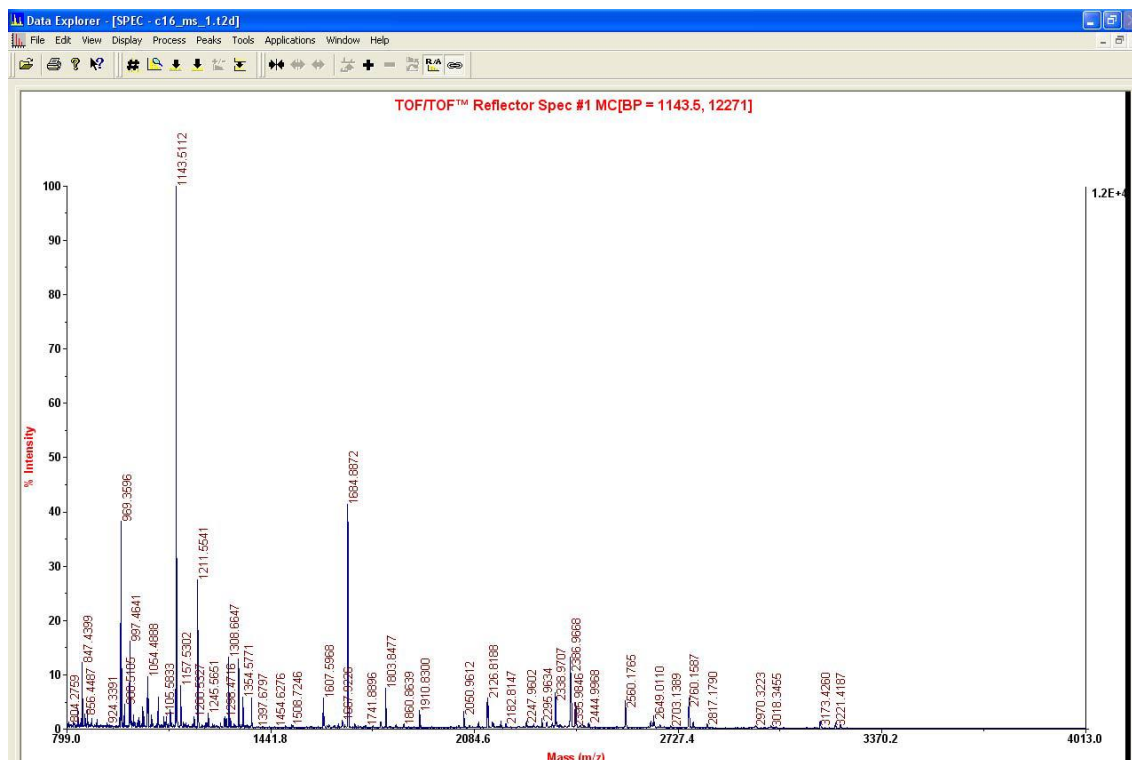
Muestra: 1)+FSH+PNGasa30

Placa: Febrero9 2019

Posición: C14

Espectro de masa obtenido en modo reflector positivo

(seleccionar imagen y aumentar el zoom para ver la imagen correctamente)



Search Parameters

Type of search : Sequence Query

Enzyme : Trypsin

Fixed modifications : Carbamidomethyl (C)

Variable modifications : Oxidation (M), Deamidated (NQ)

Mass values : Monoisotopic

Protein Mass : Unrestricted

Peptide Mass Tolerance : ± 0.08 Da

Fragment Mass Tolerance : ± 0.6 Da

Max Missed Cleavages : 1

Instrument type : MALDI-TOF-TOF

Number of queries : 147

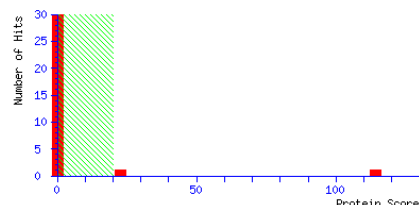
Resultado del análisis utilizando el motor de búsqueda Mascot

(www.matrixscience.com)

Database : Uniproteina 2013-01-24 (6105 sequences; 2053033 residues)
Timestamp : 10 May 2019 at 13:55:38 GMT
Protein hits : [KarinGrumberg_FSH](#)
[sp|Q51368|TONB_PSEAE](#) Protein TonB OS=Pseudomonas aeruginosa (strain ATCC 15692 / FAO1 / 1C / PRS 101 / LMG 12228)

Mascot Score Histogram

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
Individual ions scores > 20 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).
Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Peptide Summary Report

Format As: **Peptide Summary** [Help](#)

Significance threshold $p < 0.05$ Max. number of hits: **AUTO**

Standard scoring ☐ MudPIT scoring ☒ Ions score or expect cut-off: **0** Show sub-sets: **0**

Show pop-ups ☒ Suppress pop-ups ☐ Sort unassigned: **Decreasing Score** Require bold red: ☐

Select All Select None Search Selected ☐ Error tolerant Archive Report

1. [KarinGrumberg_FSH](#) Mass: 30538 Score: 114 Matches: 6(4) Sequences: 6(4) emPAI: 1.29
☐ Check to include this hit in error tolerant or archive report

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calco)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
☒ 31	1143.5112	1142.5039	1142.5179	-0.0140	0	57	1.1e-005	1	U	R.GLGPSYCSFR.E
☒ 47	1354.5771	1353.5698	1353.5904	-0.0206	0	47	7.1e-005	1	U	K.NITSEATCCVAK.A + Deamidated (NQ)
☒ 56	1508.7246	1507.7173	1507.7440	-0.0266	0	18	0.15	1	U	R.SCELTNITITVEK.E + Deamidated (NQ)
☒ 67	1684.8872	1683.8799	1683.9056	-0.0257	1	20	0.12	1	U	R.DLVYRDFARPNQK.T
☒ 95	2125.8596	2124.8523	2124.8088	0.0435	0	20	0.011	1	U	R.VENHTECHCSTCYHK.S + Deamidated (NQ)
☒ 132	2649.0110	2648.0037	2648.0440	-0.0403	0	35	0.0003	1	U	K.EECGFCISINTTWCAGYCYTR.D + Deamidated (NQ)

Protein View

Match to: [KarinGrumberg_sin_peptido_senal](#) Score: 271 Expect: 4.8e-024

Nominal mass (M_n): 28155; Calculated pI value: 8.01
NCBI BLAST search of [KarinGrumberg_sin_peptido_senal](#) against nr
Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications
Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
Variable modifications: Oxidation (M), Deamidated (NQ)
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Sequence Coverage: 76%

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 HHHHHRSCE LTNITITVEK EECGFCISIN TTWCAGYCYT RDLVYRDFAR
51 FNIQKCTCFK ELVYETVKVP GCAHADSLEY TYFVATECHC SKCDSSTDC
101 TVRGLGFSYC SFREIKESSS SKAPPSLPS PSRLGPSDT PILPQFDGE
151 FTMQGCECK LKRNKYSKP DAPIYQMGCCFSR RSKKTMLEVK
201 NITSEATCCV AKATYATVM GNVVENHTE CHCSTCYHK S

Show predicted peptides also

Sort Peptides By: ☒ Residue Number ☐ Increasing Mass ☐ Decreasing Mass

Start	End	Observed	Mr(expt)	Mr(calco)	Delta	Miss	Sequence
1	7	997.4641	996.4568	996.4651	-0.0083	0	-HHHHHRR.S (No match)
8	20	1508.7246	1507.7173	1507.7440	-0.0266	0	R.SCELTNITITVEK.E Deamidated (NQ) (Ions score 18)
21	41	2649.0110	2648.0037	2648.0440	-0.0403	0	K.EECGFCISINTTWCAGYCYTR.D Deamidated (NQ) (Ions score 35)
42	55	1684.8872	1683.8799	1683.9056	-0.0257	1	R.DLVYRDFARPNQK.T (Ions score 20)
47	55	1038.5565	1037.5492	1037.5618	-0.0125	0	R.DPARPNQK.T (No match)
47	60	1676.8048	1675.7975	1675.8352	-0.0377	1	R.DPARPNQKCTFK.E Deamidated (NQ) (No match)
61	68	980.5185	979.5112	979.5226	-0.0114	0	K.ELVYETVK.V (No match)
93	103	1315.4836	1314.4763	1314.4817	-0.0053	0	K.CDSSTDCVTR.G (No match)
104	113	1143.5112	1142.5039	1142.5179	-0.0140	0	R.GLGPSYCSFR.E (Ions score 57)
123	133	1105.5833	1104.5760	1104.5927	-0.0167	0	K.APPPSLPSPR.L (No match)
134	160	3018.3455	3017.3382	3017.3609	-0.0227	0	R.LGPSDTPILPQFDGEFTMQGCECK.L (No match)
134	160	3035.3503	3034.3430	3034.3399	0.0032	0	R.LGPSDTPILPQFDGEFTMQGCECK.L Oxidation (M); Deamidated (NQ) (No match)
163	184	2758.1514	2757.1441	2757.1808	-0.0366	1	K.ENKYSKPDAPYQMGCCFSR.A (No match)
163	184	2760.1587	2759.1514	2759.1488	0.0026	1	K.ENKYSKPDAPYQMGCCFSR.A 2 Deamidated (NQ) (No match)
163	184	2774.1768	2773.1695	2773.1757	-0.0062	1	K.ENKYSKPDAPYQMGCCFSR.A Oxidation (M) (No match)
166	184	2386.9668	2385.9595	2386.0003	-0.0408	0	K.YFSKPDAPYQMGCCFSR.A (No match)
166	184	2402.9685	2401.9612	2401.9952	-0.0340	0	K.YFSKPDAPYQMGCCFSR.A Oxidation (M) (No match)
201	212	1354.5771	1353.5698	1353.5904	-0.0206	0	K.NITSEATCCVAK.A Deamidated (NQ) (Ions score 47)
217	224	847.4399	846.4326	846.4382	-0.0055	0	K.ATVMGNVR.V (No match)
217	224	863.4311	862.4238	862.4331	-0.0093	0	K.ATVMGNVR.V Oxidation (M) (No match)
225	240	2125.8596	2124.8523	2124.8088	0.0435	0	R.VENHTECHCSTCYHK.S Deamidated (NQ) (Ions score 20)

Link “peptide summary report”:

http://ubypa8/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20190510/F012541.dat

Link “protein summary report”:

http://ubypa8/mascot/cgi/master_results.pl?file=../data/20190510/F012541.dat&RE

PTYPE=protein&_sigthreshold=0.05&REPORT=AUTO&_server_mudpit_switch=0.0000001

&_ignoreionsscorebelow=0&_showsubsets=0&_showpopups=TRUE&_sortunassigned=scoredo

wn&_requireboldred=0

Link “protein view”:

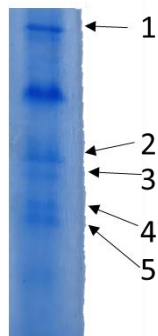
http://ubypa8/mascot/cgi/protein_view.pl?file=../data/20190510/F012541.dat&hit=1

Conclusión:

- En esta muestra se identifica de manera estadísticamente significativa la siguiente proteína:
 - “bFSH” con una cobertura de secuencia del 76%.

Anexo 5

Resultado de Espectrometría de masas de las bandas 1 a 5 señaladas en el siguiente gel de SDS-PAGE. Se sembró la bFSH purificada por IMAC con lavado con 25 mM de imidazol.



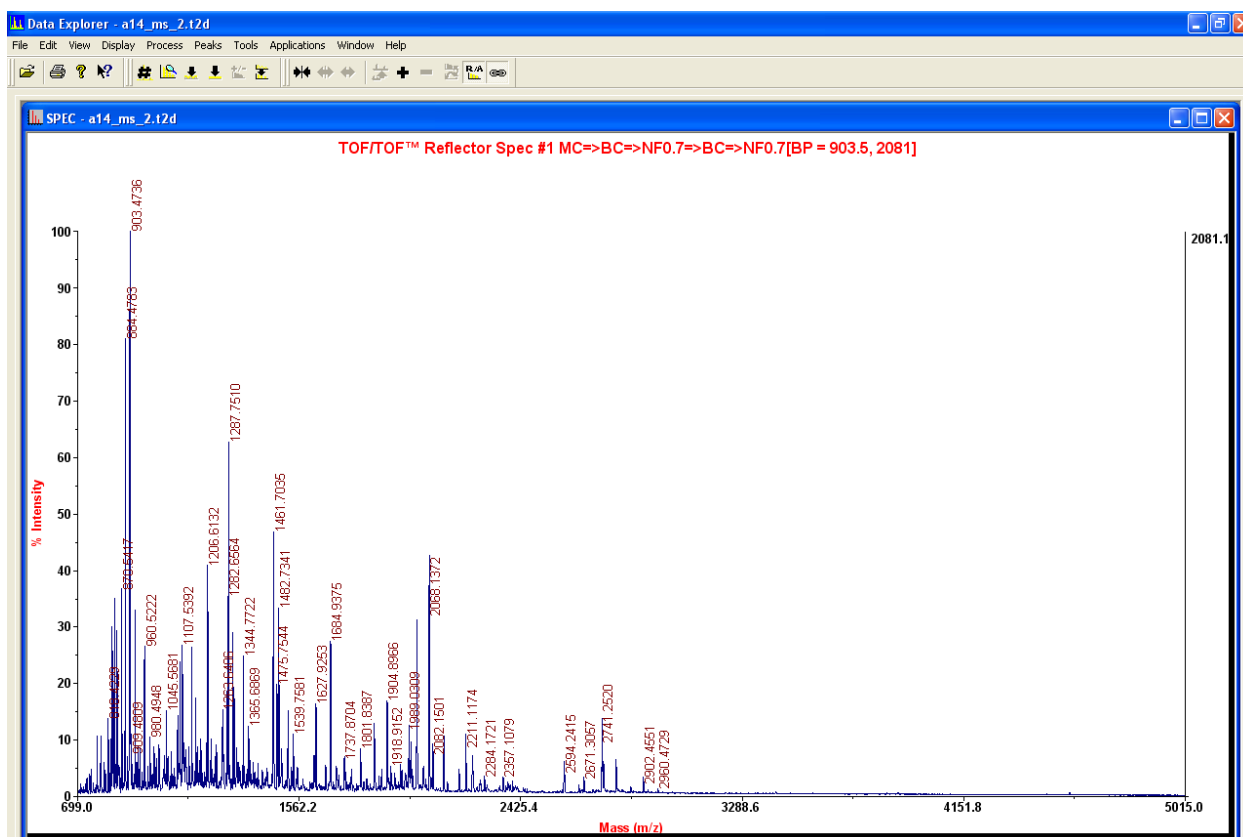
Muestra: **1**

Placa: **1_2020**

Posición: **A14**

Espectro de masa obtenido en modo reflector positivo

(seleccionar imagen y aumentar el zoom para ver la imagen correctamente)



Conclusión:

- En esta muestra no se identifica de manera estadísticamente significativa ninguna proteína.

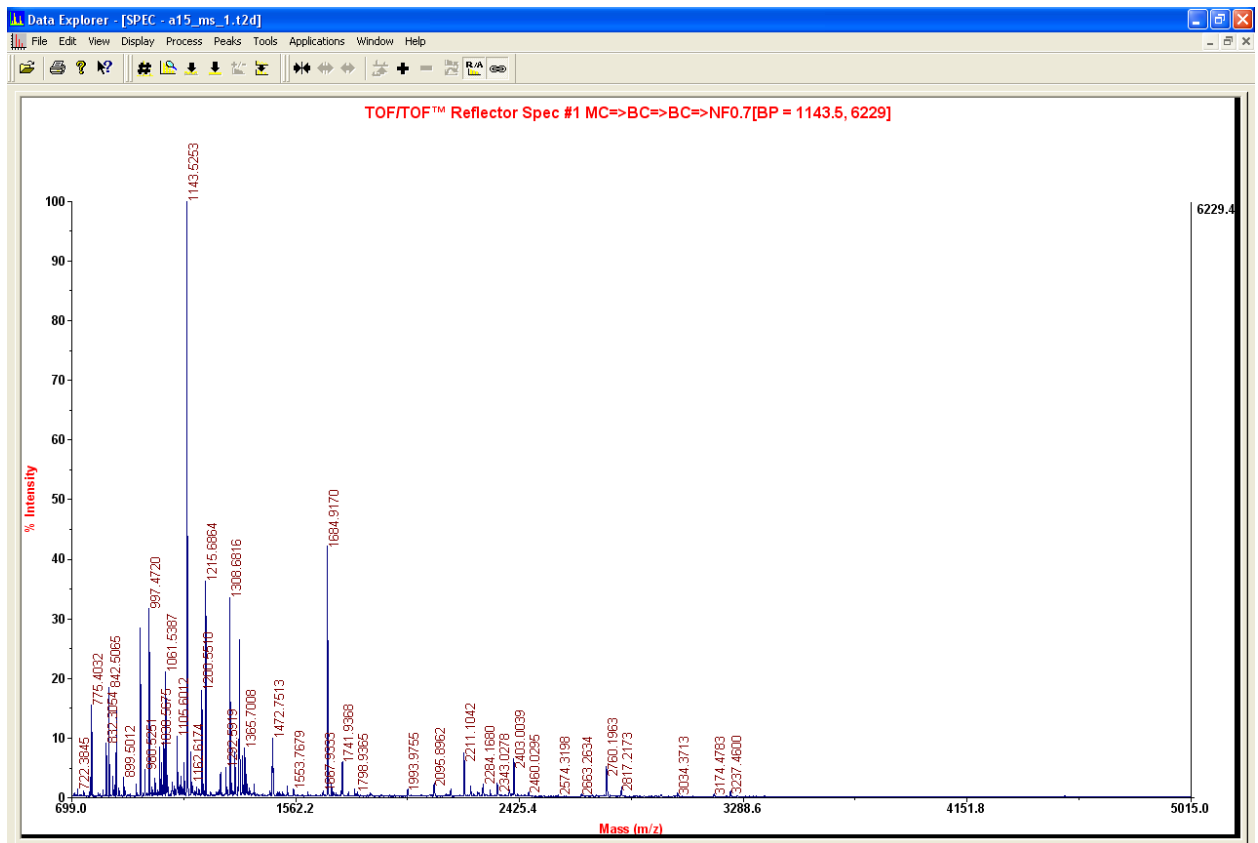
Muestra: 2

Placa: 1_2020

Posición: A15

Espectro de masa obtenido en modo reflector positivo

(seleccionar imagen y aumentar el zoom para ver la imagen correctamente)



Protein View

Match to: KarinGrumberg_sin_peptido_senal Score: 220 Expect: 6.1e-019

Nominal mass (M_z): 26901; Calculated pI value: 8.01
NCBI BLAST search of [KarinGrumberg sin peptido senal](#) against nr
Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Variable modifications: Oxidation (M), Carbamidomethyl (C)
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Sequence Coverage: 64%

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 HHHHHHSCE LTNITITVEK EECGFCSIN TTWACAGYCYT RDLVYRDPAR
51 PNIQK^TITCFK ELVYETVKVP GCAHHADSLY TYFVATECHC SKCDS^DSDTDC
101 TVRGLGSPYC SFREIKESS SKAPPSLPS PSRLPGPSD PILPFPDGE
151 FTMQGCPECK LKENKYFSKP DAPIYQCMGC CFSRAYPTPA RSKKTM^LLVFK
201 NITSEATSCA AKAF^TKATVM GNVRVN^HENHE CHSCSYHKH S

☐ Show predicted peptides also

Sort Peptides By ☒ Residue Number ☐ Increasing Mass ☐ Decreasing Mass

Start	End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Miss	Sequence
1	- 7	997.4720	996.4647	996.4651	-0.0004	0	-.HHHHHHR.S (Ions score 23)
21	- 46	3237.4600	3236.4527	3236.3824	0.0703	1	K.EECGFCSINTTWAGVCYTRDLVYR.D 3 Carbamidomethyl (C) (No match)
42	- 55	1684.9170	1683.9097	1683.9056	0.0041	1	R.DLVYRDPARPNIQK.T (Ions score 23)
47	- 55	1038.5675	1037.5602	1037.5618	-0.0015	0	R.DPARPNIQK.T (No match)
61	- 68	980.5251	979.5178	979.5226	-0.0048	0	K.ELVETVVK.V (No match)
69	- 92	2760.1963	2759.1890	2759.1891	-0.0000	0	K.VPGCAHHADSLTYTFVATECHCSK.C 3 Carbamidomethyl (C) (Ions score 82)
104	- 113	1086.5045	1085.4972	1085.4964	0.0008	0	R.GLGPSYCSFR.E (No match)
104	- 113	1143.5253	1142.5180	1142.5179	0.0001	0	R.GLGPSYCSFR.E Carbamidomethyl (C) (Ions score 12)
123	- 133	1105.6012	1104.5939	1104.5927	0.0012	0	K.APPPSLPSPSR.L (No match)
134	- 160	3034.3713	3033.3640	3033.3559	0.0082	0	R.LPGSDTPIPLPQFPDGEFTMQCCECK.L Oxidation (M); 2 Carbamidomethyl (C) (No match)
166	- 184	2387.0127	2386.0054	2386.0003	0.0051	0	K.YFSKRPDPIYQCMGCCFSR.A 3 Carbamidomethyl (C) (No match)
166	- 184	2403.0039	2401.9966	2401.9952	0.0014	0	K.YFSKRPDPIYQCMGCCFSR.A Oxidation (M); 3 Carbamidomethyl (C) (Ions score 9)
185	- 191	775.4032	774.3959	774.4024	-0.0065	0	R.AYTPPAR.S (No match)
217	- 224	863.4376	862.4303	862.4331	-0.0028	0	K.ATVMGNVR.V Oxidation (M) (No match)

Conclusión:

Resultado de la búsqueda en base de datos local:

- En esta muestra se identifica de manera estadísticamente significativa la siguiente proteína:
 - “bFSH” con una cobertura de secuencia del 64%

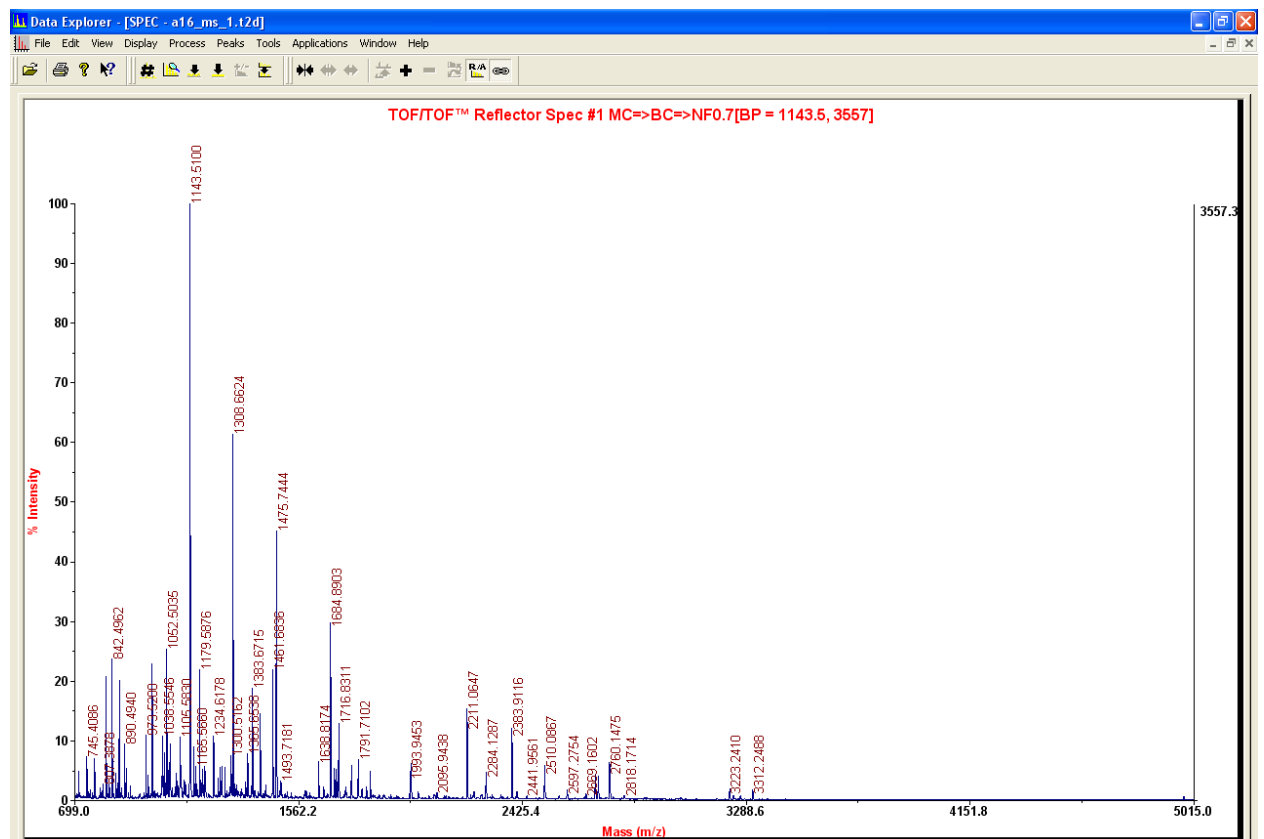
Muestra: **3**

Placa: **1_2020**

Posición: **A16**

Espectro de masa obtenido en modo reflector positivo

(seleccionar imagen y aumentar el zoom para ver la imagen correctamente)



Protein View

Match to: KarinGrumberg_sin_peptido_senal Score: 192 Expect: 3.9e-016

Nominal mass (M_r): 26901; Calculated pI value: 8.01

NCBI BLAST search of [KarinGrumberg_sin_peptido_senal](#) against nr
Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Variable modifications: Deamidated (NQ), Oxidation (M), Carbamidomethyl (C)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Sequence Coverage: 54%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```
1 HHHHHHRSC LTNITITVEK EECGFCISIN TWCAGYCYT RDLVYRDPAR
51 PNIQKTCTFK ELVYETVKVP GCAHHADSLY TYPVATECHC SKCDSSTDC
101 TVRGLGPSYC SFREIKESS SKAPPSLPS PSRLPGPSDT PILPQFPDGE
151 FTMQGCPECK LKENKYFSKP DAPIYQCMGC CFSRAYPTPA RSKKTMVLVPK
201 NITSEATCCV AKAPTKATVM GNVRVENHTE CHCSTCYHK S
```

Show predicted peptides also

Sort Peptides By ☒ Residue Number ☐ Increasing Mass ☐ Decreasing Mass

Start - End	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Miss	Sequence
1 - 7	997.4585	996.4512	996.4651	-0.0139	0	-.HHHHHR.S (No match)
42 - 55	1684.8903	1683.8830	1683.9056	-0.0226	1	R.DLVYRDPARPNQK.T (Ions score 26)
47 - 55	1038.5546	1037.5473	1037.5618	-0.0144	0	R.DPARPNQK.T (No match)
61 - 68	980.5154	979.5081	979.5226	-0.0145	0	K.ELVYETVK.V (No match)
69 - 92	2760.1475	2759.1402	2759.1891	-0.0488	0	K.VPGCAHHADSLYTPVATECHCSK.C 3 Carbamidomethyl (C) (Ions score 72)
104 - 113	1143.5100	1142.5027	1142.5179	-0.0152	0	R.GLGPSYCSFR.E Carbamidomethyl (C) (Ions score 43)
123 - 133	1105.5830	1104.5757	1104.5927	-0.0170	0	K.APPPSLPSFR.L (No match)
166 - 184	2402.9753	2401.9680	2401.9952	-0.0272	0	K.YFSKPDAPYQCMGCCFSR.A Oxidation (M); 3 Carbamidomethyl (C) (No match)
185 - 191	775.3948	774.3875	774.4024	-0.0149	0	R.AYTPAR.S (No match)
194 - 200	832.4654	831.4581	831.4888	-0.0307	1	K.KTMLVPK.N Oxidation (M) (No match)
201 - 216	1744.8295	1743.8222	1743.8171	0.0051	1	K.NITSEATCCVAKAPTK.A Deamidated (NQ); Carbamidomethyl (C) (No match)
217 - 224	863.4250	862.4177	862.4331	-0.0154	0	K.ATVMGNVR.V Oxidation (M) (No match)

Conclusión:

Resultado de la búsqueda en base de datos local:

- En esta muestra se identifica de manera estadísticamente significativa la siguiente proteína:
 - “bFSH” con una cobertura de secuencia del 54%

Muestra: **4**

Placa: **1_2020**

Posición: **A17**

Espectro de masa obtenido en modo reflector positivo

TOF/TOF™ Reflector Spec #1 MC=>BC=>NF0.7[BP = 775.4, 3307]

Mass (m/z)

Mass (m/z)	% Intensity
732.3331	~10
750.4374	~10
775.3915	100
805.5067	~10
842.4941	~10
853.4243	~10
900.4470	~10
965.5127	~10
997.4586	~10
1038.5514	~10
1055.5931	~10
1105.6950	~10
1143.5081	~10
1162.6038	~10
1200.5332	~10
1272.5736	~10
1330.6401	~10
1355.6836	~10
1436.7562	~10
1463.7489	~10
1533.7913	~10
1560.8046	~10
1637.8188	~10
1684.8920	~10
1741.9110	~10
1798.9203	~10
1860.9340	~10
1993.9482	~10
2095.9564	~10
2153.9816	~10
2211.0718	~10
2268.0762	~10
2338.9795	~10
2402.9724	~10
2459.9863	~10
2517.0303	~10
2632.2656	~10
2760.1511	~10
2817.1765	~10
3017.1233	~10
3074.1445	~10
3237.4128	~10

Match to: KarinGrumberg sin peptido senal Score: 182 Expect: 3.9e-015

Nominal mass (M_r): 26901; Calculated pI value: 8.01

NCBI BLAST search of [KarinGrumberg sin peptido senal](#) against nr
Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Variable modifications: Deamidated (NQ), Oxidation (M), Carbamidomethyl (C)
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Sequence Coverage: 58%

Matched peptides shown in **Bold Red**

1 HHHHHHSCE LINITIIVEK EECGFCSIN TTWACAGCYT RDLVYRDPAR
51 PNIQKTCIFK ELVYETVKVP GCAHHADSLY TYFVATECHC SKCDSDSIDC
101 TVRGLGPSYC SFREIEKSSS SKAPPPSLPS PSRLPGPSDT PILQFPDGE
151 FTMQGCPECK LKENVYFSKP DAPIYQCMGC CFSRAYPTFA RSKKTMVLVPK
201 NITSEATSCG AKAFATATVM GNVRVENHTE CHSCSTCYHK S

☐ Show predicted peptides also

Sort Peptides By ☒ Residue Number ☐ Increasing Mass ☐ Decreasing Mass

Start	End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss Sequence
1	7	997.4516	996.4513	996.4651	-0.0138	0 - HHHHHH.R (No match)
21	46	3236.4128	3236.4105	3236.3824	0.0031	1 K.EKCCFCFCISINTTMCACGYCTRDIVLR.D 3 Carbamidomethyl (C) (No match)
42	55	1846.8920	1683.8847	1683.9056	-0.0209	1 R.DLVYRDPARNPIQK.T (Ions score 25)
47	55	1038.5514	1037.5441	1037.5618	-0.0176	0 R.DPARNVIQK.T (No match)
61	68	980.5122	979.5049	979.5226	-0.0177	0 K.ELVYRDTVK.V (No match)
104	113	1143.5081	1142.5008	1142.5179	-0.0171	0 R.GLGFSYCSFR.E Carbamidomethyl (C) (Ions score 60)
123	133	1105.5850	1104.5777	1104.5927	-0.0150	0 K.APPFSLPSR.L (No match)
134	160	3035.3230	3034.3157	3034.3399	-0.0242	0 R.LPGSDVITLPIQPFPGDFITMGCCPCK.L Deamidated (NQ); Oxidation (M); 2 Carbamidomethyl (C) (No match)
163	184	2760.5110	2759.1438	2759.1488	-0.0050	1 K.ENKVFSEKDPATIQYMGCCFSR.A 2 Deamidated (NQ); 3 Carbamidomethyl (C) (No match)
166	184	2386.9709	2385.9636	2386.0003	-0.0367	0 K.YFSEKDPATIQYMGCCFSR.A 3 Carbamidomethyl (C) (No match)
166	184	2402.9724	2401.9651	2401.9952	-0.0301	0 K.YFSEKDPATIQYMGCCFSR.A Oxidation (M); 3 Carbamidomethyl (C) (Ions score 39)
185	191	775.3915	774.3842	774.4024	-0.0182	0 R.AYPTPAR.S (No match)
194	200	832.4175	831.4102	831.4888	-0.0786	1 K.KTMLVPEK.N Oxidation (M) (No match)
217	224	847.4304	846.4231	846.4382	-0.0150	0 K.ATVMGNVR.V (No match)
217	224	863.4243	862.4170	862.4331	-0.0161	0 K.ATVMGNVR.V Oxidation (M) (No match)

124

Resultado de la búsqueda en base de datos local:

- En esta muestra se identifica de manera estadísticamente significativa la siguiente proteína:
 - “bFSH” con una cobertura de secuencia del 58%

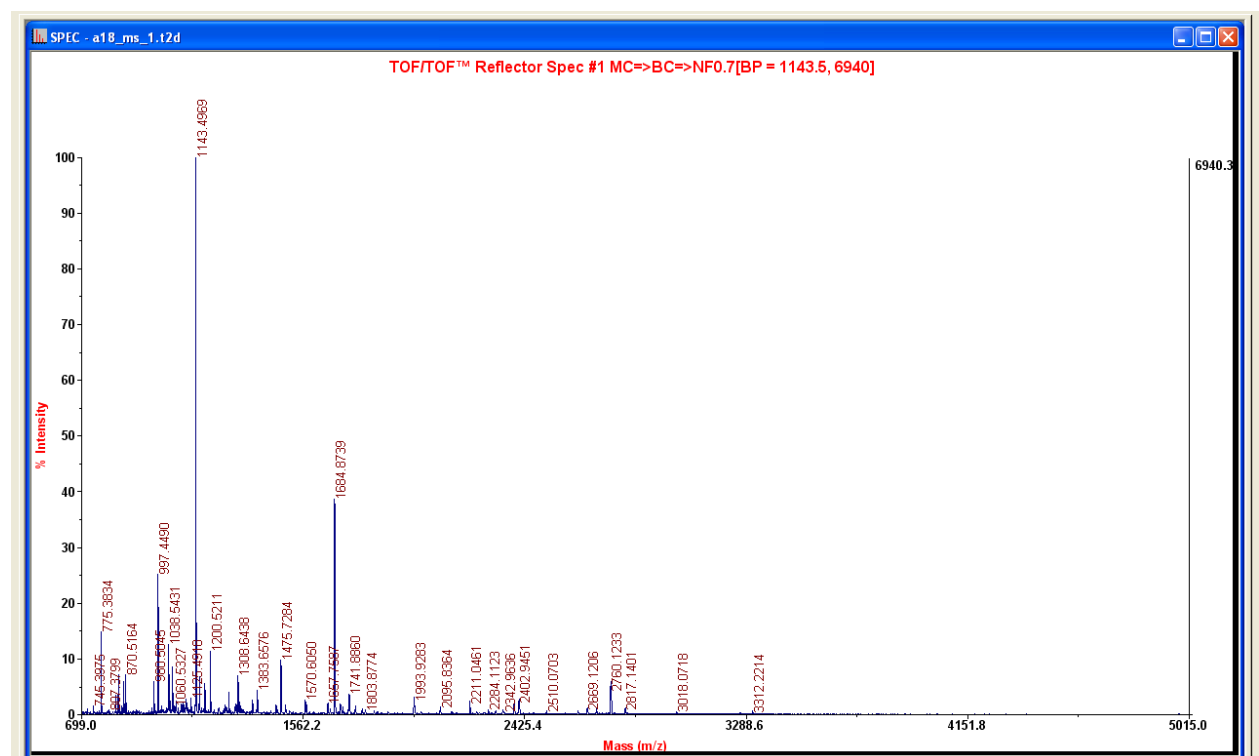
Muestra: **5**

Placa: **1_2020**

Posición: **A18**

Espectro de masa obtenido en modo reflector positivo

(seleccionar imagen y aumentar el zoom para ver la imagen correctamente)



Protein View

Match to: KarinGrumberg_sin_peptido_senal Score: 266 Expect: 1.5e-023

Nominal mass (M_r): 26901; Calculated pI value: 8.01

NCBI BLAST search of [KarinGrumberg_sin_peptido_senal](#) against nr
Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Variable modifications: Oxidation (M), Carbamidomethyl (C)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Sequence Coverage: 57%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1  HHHHHHRSCE LINITITVEK EECGFCISIN ITWCAGYCYT RDLVYRDPAR
51 PNIQKTCTFK ELVYETVRVP GCAHHADSLY TYPVATECHC SKCDSSTDC
101 TVRGLGPSYC SFREIKESSS SKAPPPSLPS PSRLPGPSDT PILPQFPDGE
151 FTMQGCPECK LKENKYFSKP DAPIYQCMGC CFSRAYPTPA RSKTMTLVK
201 NITSEATCCV AKAFTRATVM GNVVENHTE CHCSTCYHK S

```

Show predicted peptides also

Sort Peptides By: ☒ Residue Number ☐ Increasing Mass ☐ Decreasing Mass

Start	End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
1	7	997.4490	996.4417	996.4651	-0.0234	0	-.HHHHHR.S (Ions score 30)
42	55	1684.8739	1683.8666	1683.9056	-0.0390	1	R.DLVYRDPARPNIQK.T (Ions score 29)
47	55	1038.5431	1037.5358	1037.5618	-0.0259	0	R.DPARPNIQK.T (No match)
61	68	980.5045	979.4972	979.5226	-0.0254	0	K.ELVYETVRK.V (No match)
69	92	2760.1233	2759.1160	2759.1891	-0.0730	0	K.VPGCAHHADSLYTYPVATECHCSK.C 3 Carbamidomethyl (C) (Ions score 62)
93	103	1315.4679	1314.4606	1314.4817	-0.0210	0	K.CDSSTDCCTVR.G 2 Carbamidomethyl (C) (No match)
104	113	1086.4784	1085.4711	1085.4964	-0.0253	0	R.GLOPSYCSFR.E (No match)
104	113	1143.4969	1142.4896	1142.5179	-0.0283	0	R.GLOPSYCSFR.E Carbamidomethyl (C) (Ions score 52)
104	116	1456.7666	1455.7593	1455.7180	-0.0413	1	R.GLOPSYCSFREIK.E (No match)
117	133	1710.8549	1709.8476	1709.8584	-0.0108	1	K.ESSSKAPPPSLPSPSR.L (No match)
123	133	1105.5632	1104.5559	1104.5927	-0.0368	0	K.APPPSLPSPSR.L (No match)
163	184	2774.1475	2773.1402	2773.1757	-0.0355	1	K.ENKYFSKFDAPYQCMGCCFSR.A Oxidation (M); 3 Carbamidomethyl (C) (No match)
166	184	2402.9451	2401.9378	2401.9952	-0.0574	0	K.YFSKFDAPYQCMGCCFSR.A Oxidation (M); 3 Carbamidomethyl (C) (No match)
185	191	775.3834	774.3761	774.4024	-0.0263	0	R.AYPTPAR.S (No match)
194	200	832.4167	831.4094	831.4888	-0.0794	1	K.KTMLVPK.N Oxidation (M) (No match)
217	224	847.4251	846.4178	846.4382	-0.0203	0	K.ATVMGNVR.V (No match)
217	224	863.4156	862.4083	862.4331	-0.0248	0	K.ATVMGNVR.V Oxidation (M) (No match)

Conclusión:

Resultado de la búsqueda en base de datos local:

- En esta muestra se identifica de manera estadísticamente significativa la siguiente proteína:
 - “bFSH” con una cobertura de secuencia del 57%

Anexo 6: Peso de ovarios y análisis de la Varianza

A) Resultados obtenidos con bFSH purificada por IMAC con lavado con 25 mM de imidazol

Bloques	Standard			Muestra		
	S1	S2	S3	M1	M2	M3
Concentración / Dosis	0,660UI/ml	1,330UI/ml	2,660UI/ml	0,660UI/ml	1,330UI/ml	2,660UI/ml
Animal 1	72,2	76,5	95,2	74,7	73,4	86,3
Animal 2	72,8	78,9	104,1	66,4	80,8	70,3
Animal 3	73,1	83,2	90,6	79,5	70,4	55,2
Animal 4	72,5	74,1	93,8	67,7	71,9	74,7
Animal 5	71,9	77,2	101,4	71,0	73,6	69,9
Animal 6	70,8	74,4	89,7	74,1	80,1	72,4
Animal 7						
Peso promedio	72,22	77,38	95,80	72,23	75,03	71,47

Resultado del Análisis de la Varianza

Regresión :	Valida; Significativa con un $p < 0,01$
Desviación de la Linealidad :	No valida; Significativa con un $p > 0,05$
Desviación del Paralelismo :	No valida; Significativa con un $p > 0,05$
W	INVALIDO

B) Resultados obtenidos con bFSH purificada por IMAC e intercambio catiónico

Bloques	Standard			Muestra		
	S1	S2	S3	M1	M2	M3
Concentración / Dosis	0,660UI/ml	1,330UI/ml	2,660UI/ml	0,660UI/ml	1,330UI/ml	2,660UI/ml
Animal 1	75,9	114,1	130,2	67,4	71,8	98,7
Animal 2	76,0	100,6	120,2	73,2	80,4	98,3
Animal 3	87,6	88,9	128,1	66,6	83,1	103,9
Animal 4	73,3	84,8	114,9	77,4	95,4	86,6
Animal 5	73,4	94,8	119,0	75,1	67,5	110,2
Animal 6	85,0	100,1	132,4	75,2	91,2	93,4
Animal 7						
Peso promedio	78,53	97,22	124,13	72,48	81,57	98,52

Resultado del Análisis de la Varianza

Regresión :	Valida; Significativa con un $p < 0,01$
Desviación de la Linealidad :	Valida; No significativa con un $p > 0,05$
Desviación del Paralelismo :	No valida; Significativa con un $p > 0,05$
W	VALIDO

C) Resultados obtenidos con bFSH purificada por IMAC e intercambio catiónico a mayores concentraciones

	Standard			Muestra		
Bloques	S1	S2	S3	M1	M2	M3
Concentración / Dosis	0,660UI/ml	1,330UI/ml	2,660UI/ml	0,660UI/ml	1,330UI/ml	2,660UI/ml
Animal 1	69,1	94,0	110,2	84,2	71,5	108,4
Animal 2	81,0	94,7	122,7	78,2	95,0	108,8
Animal 3	80,3	102,1	130,7	86,0	82,4	99,7
Animal 4	88,5	117,4	137,3	87,5	100,8	127,4
Animal 5	115,8	101,9	131,0	90,4	100,6	119,6
Animal 6	101,8	121,0	129,5	105,7	102,0	131,9
Animal 7						
Peso promedio	89,42	105,18	126,90	88,67	92,05	115,97

Resultado del Análisis de la Varianza

Regresión :	Valida; Significativa con un $p < 0,01$
Desviación de la Linealidad :	Valida; No significativa con un $p > 0,05$
Desviación del Paralelismo :	Valida; No significativa con un $p > 0,05$
W	VALIDO

D) Resultados obtenidos con bFSH purificada con IMAC con lavado con 40 mM de imidazol

	Standard			Muestra		
Bloques	S1	S2	S3	M1	M2	M3
Concentración / Dosis	0,660UI/ml	1,330UI/ml	2,660UI/ml	0,660UI/ml	1,330UI/ml	2,660UI/ml
Animal 1	82,4	117,6	142,3	78,8	96,5	104,7
Animal 2	96,1	115,3	148,4	89,3	99,1	130
Animal 3	81,4	121,5	154,3	86,5	104,2	119,2
Animal 4	81,2	96	161,8	84,7	99,7	135,2
Animal 5	98,3	96,2	113,1	84,9	86,9	121,9
Animal 6	98,7	105,6	136,4	77,6	94,6	146,1
Animal 7						
Peso promedio	89,68	108,70	142,72	83,63	96,83	126,18

Resultado del Análisis de la Varianza

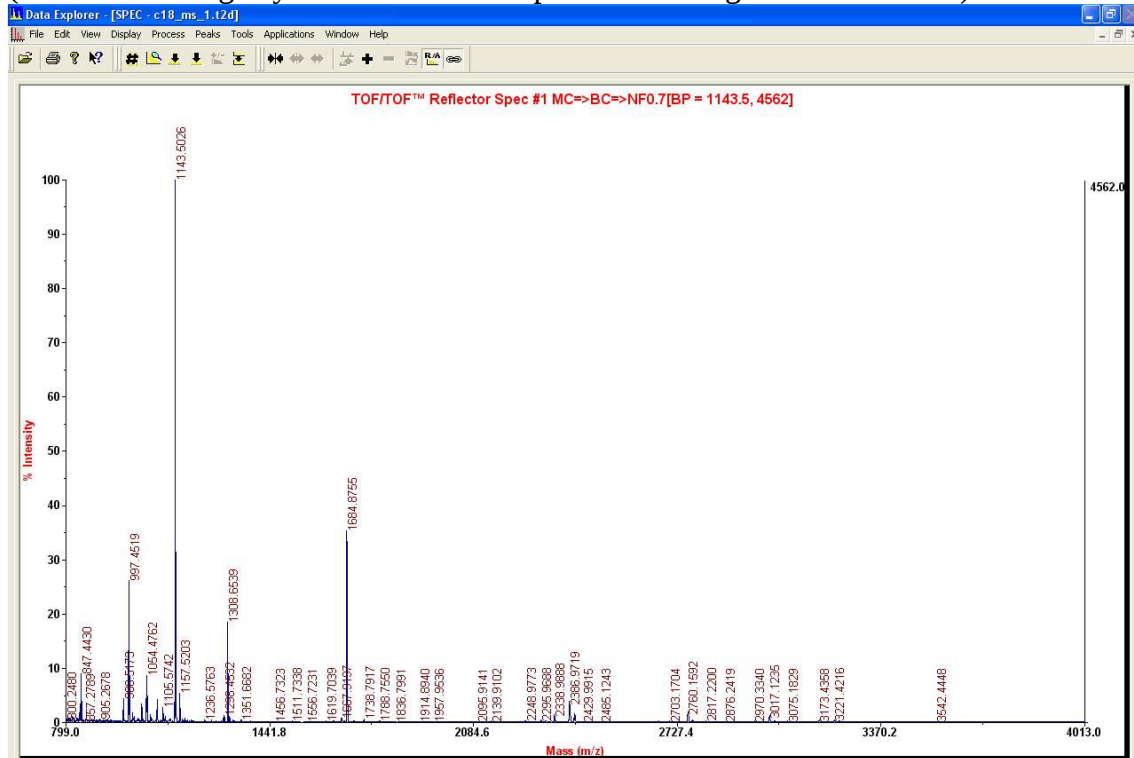
Regresión :	Valida; Significativa con un $p < 0,01$
Desviación de la Linealidad :	Valida; No significativa con un $p > 0,05$
Desviación del Paralelismo :	Valida; No significativa con un $p > 0,05$
W	VALIDO

Anexo 7

Muestra: 3)+FSH-PNGasa
Placa: Febrero 2019

Posición: C18

Espectro de masa obtenido en modo reflector positivo (seleccionar imagen y aumentar el zoom para ver la imagen correctamente)



Search Parameters

Type of search : Sequence Query

Enzyme : Trypsin

Fixed modifications : Carbamidomethyl (C)

Variable modifications : Oxidation (M), Hex(3)HexNAc(2) (N)

Mass values : Monoisotopic

Protein Mass : Unrestricted

Peptide Mass Tolerance : ± 0.08 Da

Fragment Mass Tolerance: ± 0.6 Da

Max Missed Cleavages : 1

Instrument type : MALDI-TOF-TOF

Number of queries : 137

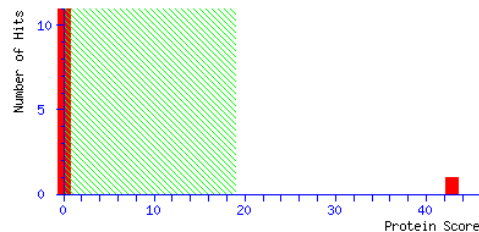
Resultado del análisis utilizando el motor de búsqueda Mascot

(www.matrixscience.com)

Email :
Search title :
Database : Uniproteina 2013-01-24 (6105 sequences; 2053033 residues)
Timestamp : 10 May 2019 at 16:25:13 GMT
Protein hits : [KarinGrumberg FSH](#)

Mascot Score Histogram

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
Individual ions scores > 19 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).
Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Peptide Summary Report

Format As: Peptide Summary Help

Significance threshold $p < 0.05$ Max. number of hits: AUTO

Standard scoring ☐ MudPIT scoring ☒ Ions score or expect cut-off: 0 Show sub-sets: 0

Show pop-ups ☒ Suppress pop-ups ☐ Sort unassigned: Decreasing Score Require bold red: ☐

Select All Select None Search Selected ☐ Error tolerant Archive Report

1. [KarinGrumberg FSH](#) Mass: 30538 Score: 43 Matches: 2 (2) Sequences: 2 (2) emPAI: 0.38
☐ Check to include this hit in error tolerant search or archive report

	Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
☒	28	1143.5026	1142.4953	1142.5179	-0.0226	0	38	0.00041	1	U	R.GLGPSYCSFR.E
☒	70	1684.8755	1683.8682	1683.9056	-0.0374	1	22	0.038	1	U	R.DLVYRDPARPNIQK.T

Protein View

Match to: [KarinGrumberg_sin_peptido_senal](#) Score: 143 Expect: $3.1e-011$

Nominal mass (M_r): 28155; Calculated pI value: 8.01
NCBI BLAST search of [KarinGrumberg_sin_peptido_senal](#) against nr
Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)
Variable modifications: Oxidation (M), Hex(3)HexNAc(2) (N)
Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Sequence Coverage: 63%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```
1 HHHHHHSCE LINITITVEK EECGFCISIN ITWCAGYCYT RDLVYRDPAR
51 PNQKTKCTFK ELVYETVKVQ GCAHADSLSY TYFVATECHC SKCDSSTDC
101 TVRGLGPSYC SFREIKESS SKAPPSLPS PSRLPGPSDT PILPQFPDGE
151 FTMQGCPECK LKENKYFSKP DAPIYQCMGC CFSRAYTPA RSKKTLVFK
201 NITSEATCCV AKAFTKATVM GNVVENHTE HCSTCYHK S
```

Show predicted peptides also

Sort Peptides By ☒ Residue Number ☐ Increasing Mass ☐ Decreasing Mass

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
1 - 7	997.4519	996.4446	996.4651	-0.0205	0	-.HHHHHR.S (No match)
42 - 55	1684.8755	1683.8682	1683.9056	-0.0374	1	R.DLVYRDPARPNIQK.T (Ions score 22)
47 - 55	1038.5504	1037.5431	1037.5618	-0.0186	0	R.DPARPNIQK.T (No match)
47 - 60	1675.8024	1674.7951	1674.8512	-0.0560	1	R.DPARPNIQKCTFK.E (No match)
61 - 68	980.5173	979.5100	979.5226	-0.0126	0	K.ELVYETVK.V (No match)
69 - 92	2760.1592	2759.1519	2759.1891	-0.0371	0	K.VPGCAHADSLSYTYFVATECHCSK.C (No match)
93 - 103	1315.5499	1314.5426	1314.4817	0.0610	0	K.CDSSTDCQTVR.G (No match)
104 - 113	1143.5026	1142.4953	1142.5179	-0.0226	0	R.GLGPSYCSFR.E (Ions score 38)
123 - 133	1105.5742	1104.5669	1104.5927	-0.0258	0	K.APPPSLSPSR.L (No match)
163 - 184	2758.1606	2757.1533	2757.1808	-0.0274	1	K.ENKYFSKPDAPYQCMGCCFSR.A (No match)
163 - 184	2774.1692	2773.1619	2773.1757	-0.0138	1	K.ENKYFSKPDAPYQCMGCCFSR.A Oxidation (M) (No match)
166 - 184	2386.9719	2385.9646	2386.0003	-0.0357	0	K.YFSKPDAPYQCMGCCFSR.A (No match)
166 - 184	2402.9729	2401.9656	2401.9952	-0.0296	0	K.YFSKPDAPYQCMGCCFSR.A Oxidation (M) (No match)
201 - 212	2245.9163	2244.9090	2244.9236	-0.0146	0	K.NITSEATCCVAK.A Hex(3)HexNAc(2) (N) (No match)
213 - 224	1294.6538	1293.6465	1293.6863	-0.0398	1	K.AFTKATVMGNVR.V (No match)
217 - 224	847.4430	846.4357	846.4382	-0.0024	0	K.ATVMGNVR.V (No match)
217 - 224	863.4342	862.4269	862.4331	-0.0062	0	K.ATVMGNVR.V Oxidation (M) (No match)
225 - 240	3017.1235	3016.1162	3016.1420	-0.0258	0	R.VENHTEHCSTCYHK.S Hex(3)HexNAc(2) (N) (No match)

Anexo 8: Secuencia teorica de la bFSH alineada con el resultado de la secuenciación de bFSH HisTag pLEXSY Hyg2.

bFSH	AGATCTGCCATGACCCAGCCGCTGGTGCGCTGCTGGCGCGGCAATGCTGGTGCGGGG	60
Secuenciacion	-----	0
bFSH	GCAGTGAGCGTGGCCATGGCGCACCACCACCACCACCACCGCAGCTGCGAGCTGACGAAC	120
Secuenciacion	-----	0
bFSH	ATCACGATCACGGTGGAGAAGGAAGAGTGC GGCTTCTGCATCAGCATCAACACGACCTGG	180
Secuenciacion	-----CCTGN ****	5
bFSH	TGCGCCGGCTACTGCTACACCCGCGACCTGGTGTACCGGACCCGGCCCGCCGAACATC	240
Secuenciacion	NGCGCCGGNTACTGCTACACCCGCGACCTGGNGTACCGGACCCGGCCCGNCCNAACATC *****	65
bFSH	CAGAAGACGTGCACGTTCAAGGAGCTGGTGTACGAGACGGTGAAGGTGCCGGGCTGCGCC	300
Secuenciacion	CAGAANACGTGCACGTTCAAGGAGCTGGTGTACGAGACGGNGAAGGTGCCGGGCTGCGCC *****	125
bFSH	CACCACGCGGACAGCCTGTACACGTACCCGGTGGCGACGGAGTGCCACTGCAGCAAGTGC	360
Secuenciacion	CACCACGCGGACAGCCTGTACACGTACCCGGNGCGACGGAGTGCCACTGCANCAAGTGC *****	185
bFSH	GACAGCGACAGCACCAGCTGCACCGTGCGCGGCTGGGCCCAGCTACTGCAGCTTCCGC	420
Secuenciacion	NACAGCGACAGCACCAGCTGCACCGTGCGCGGNTGGGCCCAGCTACTGCAGNTTCCGC *****	245
bFSH	GAGATCAAGGAGAGCAGCAGCAGCAAGGCGCGCCGCCAAGCTGCCGAGCCCAGCCGC	480
Secuenciacion	GAGATCAAGGAGAGCAGCAGCAGCAAGGCGCGCCGCCAANCCTGCCGAGCCCAGCCGC *****	305
bFSH	CTGCCGGGCCCAGCGACACCCCGATCCTGCCGAGTTCGCCGACGGGAGTTACAGATG	540
Secuenciacion	CTGCCGGNCCNANCGACACCCCGATCCTGCCGAGTTCGCCGACGGGAGTTACAGATG *****	365
bFSH	CAGGGCTGCCCGGAGTGCAAGCTGAAGGAGAACAAAGTACTTCAGCAAGCCGACGCGCCG	600
Secuenciacion	CAGGGCTGCCCGGAGTGCAAGCTGAAGGAGAACAAAGTACTTCAGCAAGCCGACGCGCCG *****	425
bFSH	ATCTACCACTGCATGGGCTGCTGCTTCAGCCGCGCTACCCGACCCGCGCCGACGAAG	660
Secuenciacion	ATCTACCACTGCATGGGCTGCTGCTTCAGCCGCGCTACNCGACCCGCGCCGACGAAG *****	485
bFSH	AAGACGATGCTGGTGCCGAAGAACATCACCAGCGAGGCCACGTGCTGCGTGGCCAAGGCC	720
Secuenciacion	AANACGATGCTGGTGNCGAANAACATCACCAGNGAGGNCACGTGCTGCGTGNNCAANGCC **	545
bFSH	TTACGAAGGCCACGGTGATGGGCACGTGCGCGTGGAGAACCACACCGAGTGCCACTGC	780
Secuenciacion	TTACGAAGGCCACGGNGATGGGNAACGTGCGCGTGNAGAANCACACCGAGTGNNACTGC *****	605
bFSH	TCCACGTGCTACTACCACAAGAGCTAGCGGCGCGC-----	815
Secuenciacion	TCCACGTGCTACTACCACAAGAGCTANGCGGCCNCTCTCTCNTCTTCNNNNNTCTTTC *****	665
bFSH	-----	815
Secuenciacion	ACGNCNCTTCTCNNNNNTANCTGNNNACNACNAGTCNNNNTTTTACNNGTACTTNTNTA	725
bFSH	-----	815
Secuenciacion	TANATGNTGNANNNTCTCTCGATGCCGTGNTCNTGNATGN	766