



**Universidad de Concepción**  
**Dirección de Postgrado**  
Facultad de Ciencias Biológicas

Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, Área Biología Celular y  
Molecular



**MODIFICACIÓN GENÉTICA DE LA RUTA DE GLICOSILACIÓN EN  
CÉLULAS EPITELIALES DE GLÁNDULA MAMARIA**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Biológicas para optar al  
Grado de Doctora en Ciencias Biológicas  
Área Biología Celular y Molecular

**SILVANA PAMELA JIMÉNEZ CHÁVEZ**  
**CONCEPCIÓN-CHILE**  
Enero 2021

Profesor Guía: Dr. Jorge Toledo Alonso  
Depto. de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en colaboración entre el Departamento de Fisiopatología y Fisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

---

Dr. Jorge R Toledo Alonso  
Profesor Guía  
Facultad de Ciencias Biológicas



---

Dra. Violeta Morín Muñoz  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

Dr. José Martínez Oyanedel  
Facultad de Ciencias Biológicas

---

Dr. Gonzalo Mardones Cofré  
Profesor Evaluador Externo  
Universidad Austral de Chile

---

Dr. Ariel Castro Alma  
Director  
Programa Doctorado en Ciencias  
Biológicas, Área Biología Celular y  
Molecular

## **AGRADECIMIENTOS:**

- A mi tutor, Dr. Jorge Toledo A. que guió el desarrollo de este trabajo (Departamento Fisiopatología, Universidad de Concepción).
- A la Dra. Raquel Montesino Seguí por su apoyo constante en el campo de la glicobiología (Departamento Fisiopatología, Universidad de Concepción).
- Al Dr. CT Yuen por guiar mi pasantía en el National Institute for Biological Standards and Control (Potters Bar, Reino Unido).
- A la Dra.(c) María José Leiva por compartir los conocimientos en el campo de la glicobiología (Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos, Departamento Fisiopatología, Universidad de Concepción).
- A las distintas fuentes de financiamiento que permitieron mi formación y el desarrollo de esta tesis:
  - CONICYT: Beca doctorado Nacional N° 21130824.
  - Proyecto Innova I+D Aplicada, Código 17-IDAE-74738 (Dr. Jorge Toledo A.)
  - Dirección de Postgrado Universidad de Concepción.
- Al Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos (Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción).
- A todo el personal técnico y administrativo del Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL .....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE TABLAS.....	X
RESUMEN .....	XII
SUMMARY.....	XIII
INTRODUCCIÓN.....	1
1. Glicosilación.....	1
2. Glicoproteínas.....	3
3. N-glicosilación.....	7
4. Eritropoyetina.....	10
5. Expresión de proteínas recombinantes y modificación de la ruta de glicosilación en distintos organismos.....	13
5.1 Expresión de proteínas y modificación de la ruta de glicosilación en procariontes.....	13
5.2 Expresión de proteínas recombinantes y modificación de la ruta de glicosilación en eucariontes inferiores.....	16
5.3 Expresión de proteínas recombinantes y modificación de la ruta de glicosilación en células de mamíferos.....	19
5.4 Expresión de proteínas recombinantes en animales transgénicos.....	22
6. La glándula mamaria como sistema de expresión de proteínas recombinantes.....	23

6.1 Transducción <i>in situ</i> de la glándula mamaria de cabras para la expresión de proteínas recombinantes como eritropoyetina humana.....	27
HIPÓTESIS .....	31
OBJETIVOS .....	32
OBJETIVO GENERAL .....	32
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
MATERIALES Y MÉTODOS .....	33
1. Cultivo celular.....	33
2. Plasmidios .....	34
3. Generación de vectores adenovirales.....	34
4. Expresión de las variantes EPOFc en cultivos de células SiHa. ....	38
5. Detección de la eritropoyetina recombinante.....	39
6. Análisis de expresión relativa de ARNm mediante qRT-PCR.....	39
7. Inmunodetección de GNT-IV en células SiHa. ....	40
8. Expresión de eritropoyetina humana en la glándula mamaria de cabra.....	41
9. Tratamiento de la leche. ....	42
10. Purificación de la eritropoyetina humana desde muestras de leche.....	42
11. Análisis del patrón de glicosilación de las variantes de EPOFc expresadas en células epiteliales de glándula mamaria de cabra.....	43
12. Ensayos de actividad hematopoyética de las variantes de EPOFc en ratones normocitémicos.....	48
RESULTADOS.....	49
1. Expresión de EPOFc y enzima GNT-IV en células SiHa.....	50

2. Expresión y purificación de EPOFc+GNT-IV en células epiteliales de glándula mamaria de cabra. ....	53
3. Análisis del perfil de N-glicanos de las variantes EPOFc por HPLC en fase normal.....	56
4. Análisis del perfil de N-glicanos de las variantes de EPOFc mediante espectrometría de masas. ....	58
5. Ensayo de actividad hematopoyética de las variantes de EPOFc obtenidas.....	62
6. Generación de los vectores adenovirales de EPOFc con enzimas glicosiltransferasas. ....	64
6.1 Construcción del vector de transferencia pAdTrack-EPOFc/GNT-IV. ..	65
6.2 Construcción del vector de transferencia pAdTrack-EPOFc/GNT-V.....	67
6.3 Construcción del vector de transferencia pAdTrack-EPOFc/ST6N.....	69
7. Generación de vectores adenovirales. ....	71
8. Análisis de la funcionalidad de los vectores adenovirales .....	74
8.1 Expresión <i>in vitro</i> de las variantes EPOFc en células SiHa. ....	74
8.2. Análisis de la expresión de las enzimas GNT-IV, GNT-V y ST6N mediante qRT-PCR.....	75
9. Expresión de las variantes de EPOFc en células epiteliales de glándula mamaria de cabra. ....	77
10. Purificación de las variantes de EPO obtenidas desde células epiteliales de glándula mamaria de cabra. ....	79
11. Análisis del patrón de N-glicanos de las variantes de EPOFc obtenidas desde glándula mamaria de cabra por HPLC.....	81
11.1 Análisis de N-glicanos de las variantes de EPOFc mediante HPLC Fase normal.....	81

11.2 Análisis de la presencia de estructuras cargadas presentes en la mezcla de N-glicanos mediante cromatografía de intercambio débil.....	85
12. Ensayo de actividad hematopoyética en ratones .....	88
DISCUSIÓN .....	90
CONCLUSIÓN .....	98
REFERENCIAS .....	99



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Tipos de N-glicanos presentes en eucariontes.....	5
<b>Figura 2:</b> Representación de la ruta de N-glicosilación en humanos.....	9
<b>Figura 3:</b> Representación de la glándula mamaria de cabra..	25
<b>Figura 4:</b> Análisis de expresión de EPOFc y EPOFc+GNT-IV en cultivos de células SiHa transducidas con los vectores AdEPOFc y AdEPOFc+AdGNT-V..	52
<b>Figura 5:</b> Purificación de la variante EPOFc+GNT-IV A: Electroforesis y Western blot de la purificación realizada en matriz de Proteína-A sefarosa.....	55
<b>Figura 6:</b> Análisis del perfil de N-glicanos de las variantes de EPOFc purificadas desde muestra de leche de glándula mamaria de cabra.....	57
<b>Figura 7:</b> Espectros de masa de glicanos N-enlazados a las variantes EPOFc expresadas en células epiteliales de glándula mamaria de la cabra.....	59
<b>Figura 8:</b> Ensayo de actividad hematopoyética en ratones normocitémicos.....	63
<b>Figura 9:</b> Construcción del vector de transferencia recombinante pAdTrack-EPOFc/GNT-IV.....	66
<b>Figura 10:</b> Construcción del vector de transferencia pAdTrack-EPOFc/GNTV... ..	68
<b>Figura 11:</b> Construcción del vector de transferencia recombinante pAdTrack-EPOFc/ST6N .....	70
<b>Figura 12:</b> Digestión de genomas adenovirales recombinantes seleccionados con enzima <i>Pacl</i> ..	72
<b>Figura 13:</b> Generación de los viriones adenovirales.....	73
<b>Figura 14:</b> Expresión in vitro de las variantes de EPOFc en cultivos de células SiHa.....	74
<b>Figura 15:</b> Análisis de la expresión relativa de EPO, GNT-IV, GNT-V y ST6N mediante qRT-PCR. ....	76



**Figura 16:** Análisis de la expresión de las variantes EPOFc en células epiteliales de glándula mamaria de cabra por Western blot..... 78

**Figura 17:** Purificación de las variantes de EPOFc en matriz Proteína A-Sefarosa ..... 80

**Figura 18:** Perfiles de N-glicanos generados mediante HPLC en fase normal en matriz de Amida-80 de variantes de EPOFc purificadas desde leche cabras.... 83

**Figura 19:** Perfiles de N-glicanos generados mediante cromatografía de intercambio débil a partir de variantes de EPOFc purificadas desde leche de cabras.....87

**Figura 20:** Ensayo de actividad hematopoyética en ratones normocitémicos... 89



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I:</b> Nomenclatura de monosacáridos frecuentes en vertebrados.....	2
<b>Tabla II:</b> Secuencia de partidores utilizados y genes analizados en los ensayos de qRT-PCR.....	40
<b>Tabla III:</b> Detalle de los peaks identificados en el ensayo de espectrometría de masa.....	60
<b>Tabla IV:</b> Detalle de las estructuras oligosacáridicas probables identificadas mediante la asignación de Unidades de Glucosa.....	84
<b>Tabla V:</b> Porcentajes de estructuras cargadas presentes en EPOFc y las variantes EPOFc modificadas.....	86



## RESUMEN

En la actualidad existen diversos sistemas para la expresión de proteínas recombinantes de uso terapéutico, y su elección dependerá del tipo de proteína que se necesita expresar ya que el sistema debe brindar un correcto procesamiento post-traducciona l de las moléculas, como el plegamiento de la estructura terciaria y cuaternaria, la glicosilación y sulfatación. Estas modificaciones garantizarán su funcionalidad biológica, con características similares a las de la proteína nativa. La transformación *in situ* de las células epiteliales de la glándula mamaria de cabras utilizando vectores virales para la modificación genética de hembras adultas, se presenta como una alternativa factible para la expresión de proteínas recombinantes con estructura terciaria y cuaternaria complejas. Además, en este sistema la proteína recombinante se secreta a la leche, que es un fluido de fácil recolección diaria. Sin embargo, las proteínas expresadas presentan un patrón de N-glicosilación característico y definido, que consiste en la presencia mayoritaria de estructuras bi-antenarias y con presencia de un único enlace de ácido siálico terminal. Si bien este patrón es funcional para la actividad biológica de algunas proteínas terapéuticas, no es suficiente para proteínas como la eritropoyetina humana, que presenta un patrón de glicosilación de tipo complejo, tetra-antenario y tetra-sialilado. Por lo tanto, la eritropoyetina expresada en células epiteliales de glándula mamaria de cabras

no presenta actividad biológica debido al patrón de N-glicanos que se añade usando este sistema.

El objetivo de esta tesis fue modificar *in vivo* la ruta de glicosilación de las células epiteliales de glándula mamaria de cabra, utilizando la eritropoyetina humana como proteína modelo. Para esto, se utilizaron vectores adenovirales que contienen la secuencia de esta hormona fusionada con al fragmento de la inmunoglobulina G humana Fc (EPOFc). Además, dichos vectores contienen las secuencias de glicoenzimas claves para la obtención de glicanos ramificados y terminados en ácido siálico. Las glicosiltransferasas utilizadas fueron las N-acetilglucosaminiltransferasas IV y V (GNT-IV, GNT-V), además, de sialiltransferasa 1 (ST6N). Se transdujeron las glándulas mamarias de cabras con los vectores EPOFc como control y con la combinación EPOFc+GNT-IV, EPOFc+ST6N, EPOFc+GNT-V+ST6N. Los análisis de los patrones de glicosilación de las distintas variantes mostraron diferencias relevantes en comparación al control. En todas las variantes obtenidas se observan estructuras con un mayor grado de ramificación. Además, las variantes que fueron expresadas en conjunto con ST6N presentaron un aumento de estructuras que contienen ácido siálico en comparación a EPOFc, sin embargo, ninguna de ellas mostró un incremento significativo de la actividad hematopoyética medida como porcentaje de hematocrito. Estos resultados preliminares nos permiten demostrar que es posible modificar la ruta de glicosilación de las células epiteliales en la glándula mamaria de cabra.

## SUMMARY

Currently there are several systems for therapeutic recombinant proteins expression, and their choice will depend on the type of protein that needs to be expressed, since the system must provide correct post-translational processing, such as tertiary and quaternary folding structure, glycosylation, among others. These modifications will guarantee their biological functionality, with similar characteristics to native protein. The *in situ* transformation of goat mammary gland epithelial cells using viral vectors for the genetic modification of adult females is presented as a feasible alternative for recombinant proteins expression with complex tertiary and quaternary structure. Moreover, in this system, the recombinant protein is secreted into the milk, which is an easily collected daily fluid. However, the proteins expressed in this system present a characteristic and defined N-glycosylation pattern, which consists majority in presence of bi-antennary structures and with a single terminal sialic acid bond. Although this pattern is functional for the biological activity of some therapeutic proteins, it is not sufficient for proteins such as human erythropoietin, which presents a complex, tetra-antennary and tetra-sialylated glycosylation pattern. Erythropoietin expressed in goat mammary gland epithelial cells does not show biological activity due to the glycan pattern added using this system.

The aim of this thesis was to modify *in vivo* the glycosylation pathway of goat mammary gland epithelial cells, using human erythropoietin as a model protein.

For this purpose, adenoviral vectors containing the sequence of this hormone fused to the human immunoglobulin G Fc fragment (EPOFc) were used. In addition, these vectors contain the sequences of key glycoenzymes for obtaining branched glycans terminated in sialic acid, thus assuring a modification in the glycosylation pattern of EPOFc expressed in goat milk. The glycosyltransferases used were N-acetylglucosaminyltransferases IV and V (GNT-IV, GNT-V), in addition to sialyltransferase 1 (ST6N). Goat mammary glands were transduced with EPOFc vectors as control and with the combination EPOFc+GNT-IV, EPOFc+ST6N, EPOFc+GNT-V+ST6N. Analysis of glycosylation patterns of different variants showed relevant differences compared to the control. In all the variants obtained, structures with a higher degree of branching were observed. In addition, the variants that were expressed together with ST6N showed an increase in sialic acid-containing structures compared to EPOFc, however, none of them showed a significant increase in hematopoietic activity measured as percentage of hematocrit. These preliminary results allow us to demonstrate that it is possible to modify the glycosylation pathway of epithelial cells in the goat mammary gland.

## INTRODUCCIÓN

### 1. Glicosilación

La glicosilación es el proceso de adición de azúcares o glicanos a moléculas mediante la acción de enzimas específicas (Cummings 2005). Los glicanos u oligosacáridos, son compuestos conformados por un determinado número de monosacáridos unidos entre sí mediante enlaces glicosídicos. Éstos pueden ser homo o heteropolímeros dependiendo del tipo de monómero y también pueden ser lineales o ramificados ('polysaccharides' 2009).

Los monosacáridos más frecuentes en vertebrados son manosa, N-acetilglucosamina, galactosa y ácido N-acetilneuroamínico (ácido siálico) entre otros que se observan en la Tabla 1 (Varki et al. 2015). Si bien estos monosacáridos son los más frecuentes en vertebrados, otros organismos también pueden contener otros, por ejemplo, en plantas se encuentran azúcares que no están presentes en animales como arabinosa (Ara), ramnosa (Rha) y fructosa (Fruc) (Strasser 2016). También las bacterias presentan monosacáridos poco comunes como ácido murámico (MurNAc) y bacilosamina (Bac) (Nothaft and Szymanski 2013).

Los monosacáridos tienen la fórmula general  $C_x(H_2O)_n$ , y consisten en una cadena de unidades de hidroximetileno quirales, las que terminan en un extremo en un grupo hidroximetil y en el otro extremo pueden terminar en un grupo

aldehído (Aldoazúcares) o en un grupo hidroxicetona (Cetoazúcares) (Ghazarian et al. 2011).

**Tabla I: Nomenclatura de monosacáridos frecuentes en vertebrados** (Modificado desde Varki et al. 2015).

Nombre grupo	Componentes del grupo	Abreviatura	Representación gráfica blanco	Representación gráfica color
Pentosas	Xilosa	Xyl	☆	★
Hexosas	Glucosa	Glc	○	●
	Manosa	Man		●
	Galactosa	Gal		●
N-Acetilhexosamina	N-Acetilglucosamina	GlcNAc	□	■
	N-Acetilgalactosamina	GalNAc		■
Desoxihexosa	Fucosa	Fuc	△	▲
Desoxinonulosoato	Ácido N-acetilneuroamínico	Neu5Ac	◇	◆
	Ácido N-glicolilneuroamínico	Neu5Gc		◆
Ácidos Hexurónicos	Ácido Iurónico	IdoA	◇	◆
	Ácido glucurónico	GlcA		◆

En su estado libre, los monosacáridos pueden presentarse en forma de cadena abierta o de anillo. La forma de anillo es la que rige en los oligosacáridos y ésta genera un centro anomérico quiral en el carbono 1 (C-1) para los aldoazúcares y en el carbono 2 (C-2) para los cetoazúcares (Engelking 2015). La numeración de los átomos de carbono sigue las reglas de la nomenclatura de la química



orgánica, donde el C-1 es el que tiene el grupo aldehído y para las cetosas C-2 es el carbono del grupo carbonilo (Krasnova and Wong 2016).

Los monosacáridos pueden estar unidos entre sí de muchas maneras, teóricamente, cada monosacárido puede generar un enlace  $\alpha$  o  $\beta$  con cualquiera de las distintas posiciones de los monosacáridos (Stylianopoulos 2013). Por ejemplo, el disacárido maltosa está formado por dos residuos de D-glucosa unidos entre sí por un enlace glicosídico entre el C-1 de la primera D-glucosa y el oxígeno del grupo hidroxilo del C-4 de la glucosa adyacente, generándose así un enlace glicosídico  $\alpha$ -1,4 (Cole and Kramer 2016).

Este proceso genera glicoconjugados que llevan unidos glicanos mediante enlaces covalentes dando origen a moléculas como proteoglicanos, glicolípidos y glicoproteínas, entre otras (Reily et al. 2019).

## **2. Glicoproteínas**

La glicosilación es una de las modificaciones post-traduccionales más comunes en las proteínas y sus funciones pueden dividirse en dos grandes categorías: propiedades estructurales y moduladoras y reconocimiento específico por otras moléculas (principalmente proteínas de unión a glicanos) (Krasnova and Wong 2016). Dentro de las propiedades estructurales, los glicanos protegen a las proteínas de la acción de proteasas y pueden bloquear la unión de anticuerpos (Buettner et al. 2018). Además, participan en el plegamiento de los polipéptidos

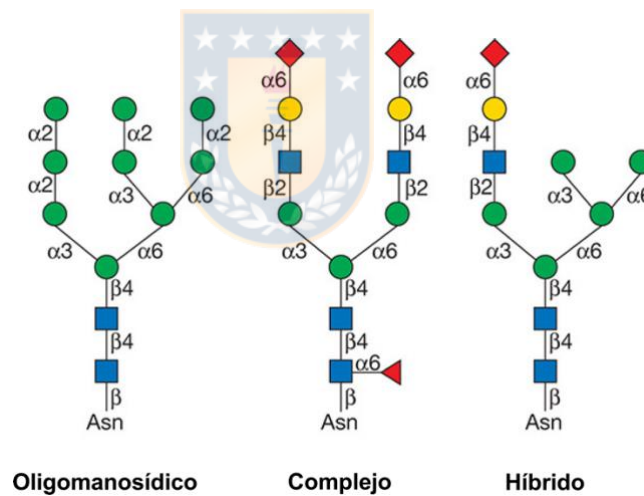
que se sintetizan en retículo endoplásmico (RE) y en la solubilidad y conformación de las proteínas (Jayaprakash and Surolia 2017).

La glicosilación también puede modular las interacciones proteína-proteína. Por ejemplo, algunos receptores de factores de crecimiento necesitan ser glicosilados para unirse a su ligando, característica que van adquiriendo en su tránsito por el aparato de Golgi lo que limita las interacciones no deseadas con el factor de crecimiento si es que ambos se sintetizan en la misma célula (Ferreira et al. 2018).

Un ejemplo de la participación de los glicanos en el reconocimiento específico de proteínas son las moléculas de adhesión selectinas, éstas reconocen glicanos específicos en los ligandos y median interacciones críticas entre las células sanguíneas y las células vasculares ya sea en condiciones normales o patológicas (Taylor and Drickamer 2019). Por otra parte, los glicanos pueden actuar enmascarando a otros monosacáridos que forman parte del glicano, como por ejemplo, los ácidos siálicos que cubren a los residuos de galactosa evitando así su reconocimiento por parte de las galectinas u otras proteínas de unión a glicanos (GBP) (D'Addio et al. 2020).

En cuanto a la estructura de los glicanos unidos a proteínas entre las distintas especies, las estructuras de los núcleos tienden a ser conservada; por ejemplo, la estructura del núcleo de N-glicanos está conservada entre todos los eucariontes y en algunos *Archea* (Lombard 2016). Sin embargo, puede haber diversidad en la cadena externa de glicosilación, generando así estructuras

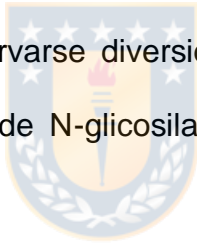
características de acuerdo a la especie. En bacterias podemos observar glicanos con reducida diversidad de monosacáridos y de cadenas simples (Nothaft and Szymanski 2010), en levaduras se observan estructuras altamente ramificadas y compuestas principalmente por manosas (oligomanosídicas) (Jigami 2008), en plantas pueden ser de tipo complejo (con presencia de “antenas” compuestas de distintos tipos de monosacáridos) o híbridas (oligomanosídicas y complejas) (Nagashima et al. 2018). En mamíferos se observan estructuras de tipo complejo con variedad de monosacáridos y ramificados (Figura 1) (Hossler et al. 2009).



**Figura 1: Tipos de N-glicanos presentes en eucariontes.** Modificado desde Aebi et al. 2017. (Aebi et al. 2017)

A diferencia de la síntesis proteica, en la glicosilación, no existe un molde a partir del cual pueda ser copiada la posición de cada monosacárido en la cadena naciente (An et al. 2009). La estructura oligosacáridica es ensamblada en la medida en que el polipéptido migra por los diferentes compartimentos de

membrana en la vía secretora. En éstos, se encuentran ancladas enzimas específicas, que median cada una de las modificaciones de la cadena de oligosacáridos (Spiro 2002). La secuencia de dicha cadena va a depender mayoritariamente de las condiciones del microambiente celular, de la disponibilidad de monosacáridos y de la localización espacial de las enzimas en el sistema de endomembranas, específicamente el RE y el aparato de Golgi (Fisher and Ungar 2016). Este proceso genera estructuras de oligosacáridos con un alto grado de heterogeneidad, en ocasiones, no todos los sitios potenciales de glicosilación son ocupados (sitio de ocupación o macroheterogeneidad por sitio). Además, puede observarse diversidad en la cadena de oligosacáridos madura en un mismo sitio de N-glicosilación (microheterogeneidad por sitio) (Zacchi and Schulz 2016).



Los dos tipos de glicosilación más comunes son la O-glicosilación y la N-glicosilación. En células animales, la O-glicosilación comienza en el aparato de Golgi con la transferencia enzimática del residuo N-acetilgalactosamina al grupo hidroxilo de un residuo de serina o treonina que esté presente en regiones ricas en prolinas denominados dominios STP (Ser/Thr/Pro) (Yang et al. 2018). Esta reacción es catalizada por una enzima GalNAc transferasa usando UDP-GalNAc como donador. Posteriormente, distintas enzimas realizan una elongación de la cadena paso a paso, lo que genera diversos núcleos de estructuras que pueden ser elongadas o modificadas por reacciones de sialilación, sulfatación, acetilación, fucosilación y extensión de polilactosaminas. Así, se identifican 8

núcleos distintos de O-glicanos (Van den Steen et al. 1998).

Esta es la forma más común y conocida de O-glicosilación y se considera que aproximadamente el 80% de las proteínas sintetizadas a través de la vía secretora son modificadas de esta forma (Wells and Feizi 2019).

### **3. N-glicosilación**

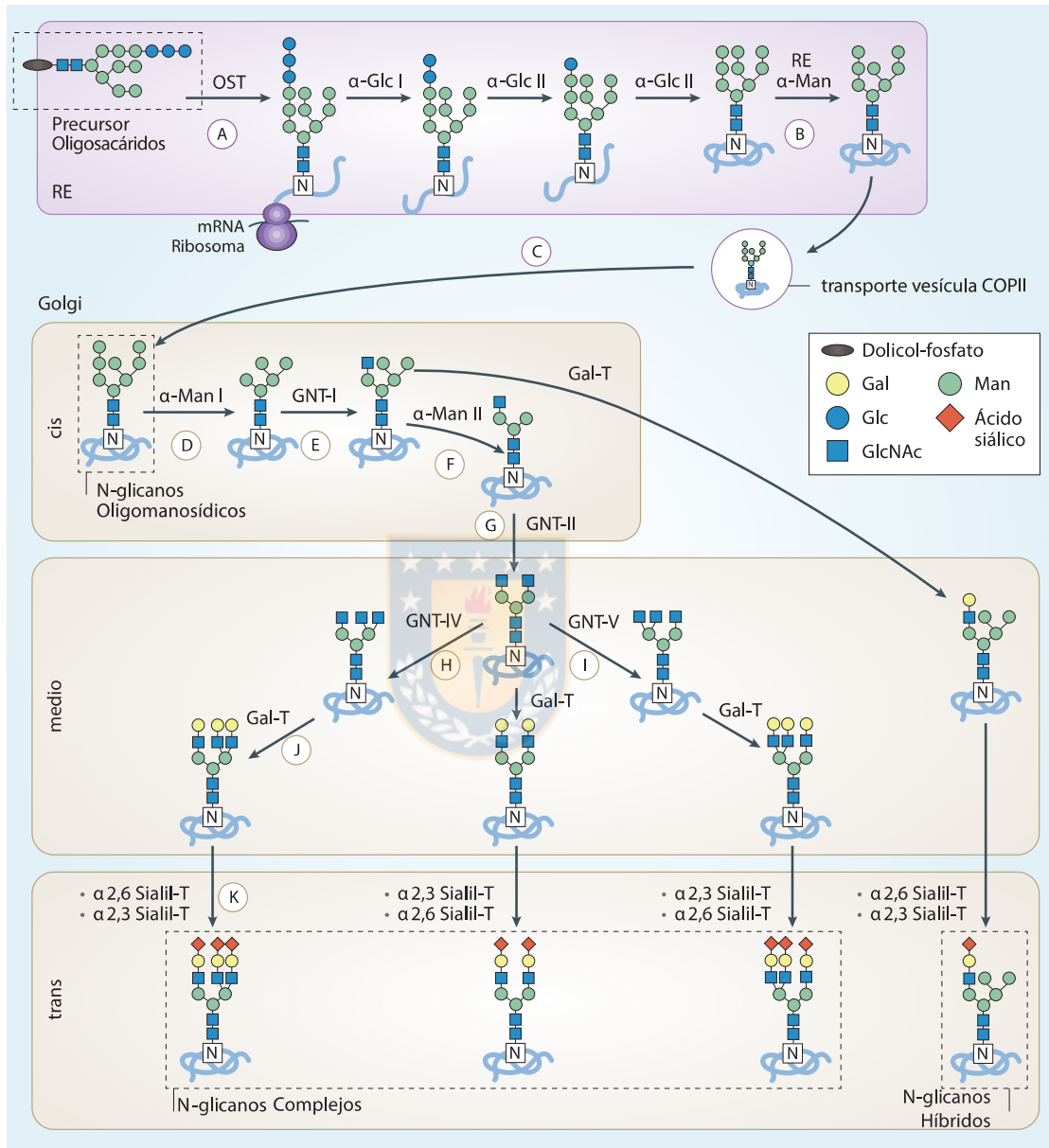
Aproximadamente el 50% de las proteínas humanas son modificadas post-traduccionalmente a través de la N-glicosilación. Esta ruta inicia en el RE, donde un núcleo de oligosacáridos pre-sintetizado compuesto de 2 N-acetilglucosaminas, 9 manosas y 3 glucosas ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ) es transferido desde el dolicol fosfato hacia la cadena polipeptídica naciente durante la traducción por acción de la enzima Oligosacariltransferasa (OST) (Breitling and Aebi 2013). Esta transferencia es sitio específica y conservada entre eucariontes inferiores y superiores e involucra el reconocimiento de la secuencia Asn-X-Ser/Thr (donde X es cualquier aminoácido excepto Prolina) conocido en la literatura como “sequon” o sitio potencial de glicosilación (Figura 2 A) (Seitz 2000).

Seguido de la transferencia del núcleo de oligosacáridos al sitio potencial de glicosilación, tres glucosas y una manosa terminal, son removidas por las enzimas glucosidasas I y II y manosidasa ER, respectivamente (Figura 2 B) (Aebi 2013). El oligosacárido resultante ( $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$ ) unido a la glicoproteína es transportado al aparato de Golgi (Figura 2 C) donde se modifica a  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$

por acción de la manosidasa I (Figura 2 D), proceso que genera el sustrato para la enzima N-acetilglucosaminiltransferasa I (GNT-I), que transfiere una N-acetilglucosamina a la manosa terminal enlazada  $\alpha$ -1,3 del núcleo (Figura 2 E) (Fukuta et al. 2001). Seguido de esta transferencia, la manosidasa II remueve las 2 manosas terminales para producir el intermediario  $\text{GlcNAcMan}_3\text{GlcNAc}_2$  (Figura 2 F). Este es un sustrato para la N-acetilglucosaminiltransferasa II (GNT-II), que añade una N-acetilglucosamina enlazada  $\alpha$ -1,6 a la manosa del núcleo de tres manosas (Figura 2 G) (Ihara 2002). Posteriormente, el oligosacárido generado ( $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ) es sustrato para la incorporación de N-acetilglucosamina en posición  $\alpha$ -1,3 por parte de GNT-IV (Figura 2H) o para la incorporación de N-acetilglucosamina en posición  $\alpha$ -1,6 por parte de GNT-V (Figura 2 I), lo que genera estructuras tri-antenadas (McDonald et al. 2014), ambas enzimas descritas también pueden ejercer su acción de manera consecutiva generando así estructuras de tipo tetra-antenadas. Finalmente, se produce la adición de galactosa a las N-acetilglucosaminas terminales por parte de la enzima galactosiltransferasa (GalT) (Figura 2 J) y la adición de ácido siálico mediante la acción de la enzima  $\alpha$ -2,3 sialiltransferasa o  $\alpha$ -2,6 sialiltransferasa lo que genera estructuras de tipo complejo (Figura 2 K) (Harduin-Lepers 2001).

En cuanto al proceso de N-glicosilación entre las distintas especies, en procariontes, la N-glicosilación ocurre en el periplasma, mientras que, en eucariontes, se inicia en la membrana del retículo endoplásmico y con el posterior procesamiento en el RE y aparato de Golgi, proceso que es conservado desde

levaduras, hasta mamíferos (Wang, et al. 2017).



**Figura 2: Representación de la ruta de N-glicosilación en humanos.** Este proceso inicia en el Retículo Endoplásmico con la adición de un oligosacárido pre sintetizado a la proteína nascente para continuar su tránsito a través de los distintos compartimentos del Aparato de Golgi generando finalmente oligosacáridos de tipo complejo, híbridos u oligomanosídicos (Modificado desde Reily et. al 2019).

#### 4. Eritropoyetina

La eritropoyetina (EPO) es una citoquina perteneciente a la superfamilia de las citoquinas tipo I y que participa en el crecimiento, supervivencia y diferenciación de las células progenitoras eritroides (Peng et al. 2020). Esta hormona se expresa como un polipéptido precursor de 193 aminoácidos que posee hacia su extremo N-terminal un péptido señal de secreción de 27 aminoácidos que se elimina durante la maduración de la proteína para presentarse finalmente como un polipéptido de 165 aminoácidos (Vocanec et al. 2019). Dentro de la secuencia aminoacídica, la EPO posee 3 sitios potenciales de N-glicosilación en las Asparaginas (Asn) 24, 38 y 83 y un sitio potencial de O-glicosilación en la Serina (Ser) 126 (Jelkmann 2007).

Estructuralmente, la EPO se caracteriza por presentar una arquitectura de paquete de cuatro hélices  $\alpha$  con topología arriba-arriba-abajo-abajo y además posee dos mini-hélices  $\alpha$  y dos hebras  $\beta$  cortas y antiparalelas. Esta estructura descrita es estabilizada por 2 puentes disulfuro entre las cisteínas 7-161 y 29-33 (Uversky and Redwan 2016).

La masa teórica de esta proteína es de 18 kDa, sin embargo, se identifica con un peso cercano a los 34 kDa de acuerdo a lo observado en análisis de SDS-Page (Bunn 2013). Esta diferencia de peso está dada por la contribución que realizan los oligosacáridos presentes en los sitios potenciales de N- y O-glicosilación y que corresponde a aproximadamente a un 40% del peso final de la proteína



(Ghezlou et al. 2020). El perfil de N-glicanos observado en la EPO recombinante es de tipo tetra-antenario y con terminaciones de ácido siálico para proteger los residuos de galactosa, lo que evita que se elimine la molécula del torrente sanguíneo por la unión a los receptores de asialoglicoproteínas presentes en el hígado (Bon et al. 2017).

El tiempo de vida media de la eritropoyetina *in vivo* depende directamente de la presencia de N-glicanos y de la estructura de éstos (Caval et al. 2018). Se observó que la concentración plasmática de la EPO en individuos sanos varía entre 6 y 32 U/L y su vida media es de 7-8 h (Ramakrishnan et al. 2004).

Aunque la actividad *in vitro* de la EPO desglucosilada es comparable a la de la molécula totalmente glicosilada, su actividad *in vivo* se reduce en aproximadamente un 90%, ya que la molécula no glicosilada se elimina rápidamente por filtración en el riñón debido a la reducción en su peso molecular (Murakami et al. 2016). Las cadenas totalmente sialiladas y el aumento de la ramificación tetra-antenaria reducen estos inconvenientes y aumentan la actividad de la EPO *in vivo* casi 10 veces, con respecto a la molécula que no está totalmente glicosilada. Además, la adición de un sitio de N-glicosilación, mediante modificación genética, también aumenta la vida media y la actividad *in vivo* (Shi et al. 2013).

Aproximadamente el 90% de la de eritropoyetina se produce en el riñón, específicamente en los fibroblastos peritubulares, y menos de un 10% se produce

en hepatocitos y células estrelladas del hígado. Además, se ha observado la expresión de la EPO en cerebro (Yasuoka et al. 2020) .

Las células del riñón utilizan la vía del Factor Inducible por Hipoxia (HIF) para regular la producción de esta molécula de forma dependiente de la tensión de oxígeno (Heir et al. 2016). En condición de hipoxia se observa una sobre-expresión de HIF lo que induce la transcripción génica de la EPO ya que este factor se une al potenciador (*enhancer*) que flanquea la región 3' del gen (Liao and Zhang 2020). Este mecanismo aumenta la producción y liberación de EPO a la circulación sanguínea donde se une a su receptor (EPOR), presente principalmente en células progenitoras eritroides. En éstas induce la proliferación y maduración desde normoblastos a reticulocitos, para que una vez que eliminen su núcleo, sean liberados desde la médula ósea hacia la circulación sanguínea (Zivot et al. 2018). Una vez que están presentes en la circulación, se produce la diferenciación a eritrocitos, que tienen una vida media de aproximadamente 120 días en un humano adulto normal. Por tanto, la administración exógena de eritropoyetina contribuye a aumentar el número de eritrocitos funcionales mejorando el transporte de oxígeno en pacientes con diferentes patologías asociadas a una deficiencia renal (Lappin and Lee 2019).

## **5. Expresión de proteínas recombinantes y modificación de la ruta de glicosilación en distintos organismos.**

La creciente demanda de proteínas recombinantes de uso terapéutico ha llevado a lo largo de los años al desarrollo de nuevas estrategias para su obtención (Lalonde and Durocher 2017). En los años 20, estas proteínas terapéuticas se extraían desde fuentes humanas o animales, como la insulina de páncreas porcino (Quianzon and Cheikh 2012) y la albúmina del plasma humano, pero la dificultad para asegurar su reproducibilidad, pureza y seguridad aceleró el desarrollo de nuevos sistemas de expresión utilizando la tecnología del ADN recombinante (Mizukami et al. 2018).

En la actualidad existen diversos sistemas para la expresión de proteínas recombinantes que van desde procariontes hasta organismos complejos como los animales transgénicos y la elección de uno u otro dependerá de la complejidad de la proteína que se quiera expresar, principalmente si ésta requiere modificaciones post-traduccionales para que sea biológicamente activa (Tripathi and Shrivastava 2019).

### **5.1 Expresión de proteínas y modificación de la ruta de glicosilación en procariontes**

*Escherichia coli* sp es una de las especies procariontes más utilizadas para la producción de proteínas recombinantes debido a la disponibilidad de diferentes

vectores y cepas que han sido desarrolladas, y la cantidad de información que existe sobre la genética y fisiología de esta bacteria (Langlais and Korn 2006). Otras cepas también utilizadas en la actualidad para la expresión de algunas proteínas son las del género *Bacillus*, *Lactococcus lactis* y *Pseudomonas* (Chen 2012; Lakowitz et al. 2018; Liu et al. 2018; Mustopa et al. 2018; Saeed et al. 2018).

Dentro de las principales ventajas de los sistemas de expresión procariontes encontramos que se pueden multiplicar en sistemas de cultivo sencillos y con una alta tasa de crecimiento (Joseph et al. 2015). Sin embargo, una de las desventajas de este sistema es que la mayoría de las cepas no realizan modificaciones post-traduccionales como la glicosilación, que sí ocurre en organismos eucariontes, lo que afecta la actividad y la estabilidad de las proteínas (Demain and Vaishnav 2009). Se ha observado la presencia de N-glicosilación en algunas cepas bacterianas como *Campylobacter jejuni*, encontrándose que este sistema sí glicosila proteínas, pero con un patrón distinto al observado en eucariontes. El tipo de oligosacárido encontrado en esta bacteria es un heptasacárido compuesto por bacilosamina, N-acetilgalactosamina y glucosa (BacGalNAc<sub>5</sub>Glc) (Nothaft and Szymanski 2010).

Desde el descubrimiento de un sistema de N-glicosilación en la bacteria *Campylobacter jejuni* (Christine M. Szymanski 1999) se ha trabajado para lograr la expresión de proteínas recombinantes de mamíferos en bacterias y que presenten un patrón de glicosilación de tipo complejo. Los primeros trabajos al

respecto estuvieron enfocados en reconstituir la ruta de glicosilación de *C. jejuni* en *E. coli*, (Pandhal and Wright 2010). Para esto se transfirió el conjunto de genes *pgl* que codifican para proteínas con secuencias muy similares a las enzimas requeridas para la biosíntesis de monosacáridos en eucariontes inferiores y mamíferos y se analizó el tipo de glicosilación presente en la proteína bacteriana AcrA, observando que se expresaba en forma glicosilada en comparación a la obtenida en la cepa *E. coli* utilizada como control (Wacker et al. 2002). Al analizar el tipo de oligosacárido unido a la proteína se observó que éste presentaba un monosacárido diferente a los que se encuentran en mamíferos denominado bacilosamina y que éste era el monosacárido a través del cual se une el heptasacárido a la proteína (Young et al. 2002). Al no ser un monosacárido presente en mamíferos, éste genera una respuesta inmune en el hospedero, por lo que los siguientes trabajos estuvieron enfocados en modificar el monosacárido unido directamente a Asn, logrando así que el primer monosacárido unido a la proteína expresada fuera GlcNAc en vez de bacilosamina (Schwarz et al. 2010). Estos trabajos pioneros, entregaron nuevas opciones de seguir mejorando este sistema procarionte para alcanzar una N-glicosilación similar a la encontrada en mamíferos.

Posteriormente, se realizaron modificaciones genéticas mediante la sobre-expresión de enzimas claves para lograr un oligosacárido con un mayor grado de ramificación, por lo que se sobre-expresaron las enzimas N-acetilglucosaminiltransferasas codificadas por los genes *Alg13* y *Alg14*, y las

manosiltransferasas codificadas por los genes *Alg1* and *Alg2*, obteniéndose N-glicanos de tipo  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$  lo que representa el núcleo de N-glicanos en mamíferos. Si bien este fue un logro muy importante en la modificación genética de la ruta de glicosilación de esta especie, los porcentajes de proteínas que presentaban este tipo de oligosacáridos representaban entre el 1-3% del total de estructuras (Valderrama-Rincon et al. 2012; Srichaisupakit et al. 2015). Aunque los trabajos descritos anteriormente significan un gran avance en la modificación de la glicosilación en bacterias, se necesitan más estudios que permitan obtener glicanos relevantes de tipo complejo (Yates et al. 2019).



## **5.2 Expresión de proteínas recombinantes y modificación de la ruta de glicosilación en eucariontes inferiores.**

Las levaduras son organismos eucarióticos unicelulares ampliamente utilizados como sistemas de expresión para proteínas recombinantes siendo *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris* las dos cepas más empleadas para este propósito (Mizukami et al. 2018). Las principales ventajas de las levaduras como sistema de expresión son su rápido crecimiento, ya que alcanzan altas densidades en un corto período de tiempo, la capacidad de realizar modificaciones post-traduccionales similares a los animales, como: el correcto plegamiento de las proteínas de origen humano, el procesamiento proteolítico de péptidos señal, la formación de puentes disulfuro y que las proteínas expresadas pueden ser secretadas al medio extracelular, lo que facilita la subsecuente

purificación (Baghban et al. 2019).

Desde el punto de vista de la glicosilación, ambas cepas de levaduras mencionadas anteriormente tienen el potencial de realizar N-glicosilación, aunque existen marcadas diferencias entre ambas (Ahmad et al. 2014). En *S. cerevisiae*, la N-glicosilación involucra la adición de numerosos residuos de manosa a través del paso por todo el aparato de Golgi lo que genera N-glicanos con hasta 100 residuos de manosa dentro de los cuales hay algunos enlazados en posición  $\alpha$ -1,3, lo que no ocurre en humanos, por lo que las proteínas producidas en este sistema pueden ser inmunogénicas (Hamilton et al. 2003). Por otra parte, *P. Pastoris* sintetiza cadenas de oligosacáridos de menor grado de polimerización (9 a 14 manosas) que carecen de cadenas de manosas enlazadas  $\alpha$ -1,3 (Goncalves 2013). Sin embargo, el hecho de que sólo se produzcan oligosacáridos del tipo oligomanosídico reduce la capacidad de este sistema para la expresión de proteínas cuya actividad biológica esté directamente ligada a un patrón de glicosilación específico (Nielsen 2013) .

Debido al potencial de las levaduras como sistema de expresión, es que desde el año 2003 se ha trabajado en la modificación de la glicosilación de estas especies. Los primeros trabajos fueron realizados en la levadura metilotrófica *P. pastoris*, en los que se eliminó su glicosilación endógena mediante el silenciamiento del gen *Ochp1* que codifica para la enzima  $\alpha$ -1,6-manosiltransferasa encargada de agregar la primera manosa al oligosacárido en formación. Además, se sobre-expresaron los genes que codifican para las

enzimas manosidasas I y II, GlcNAc transferasa I y II, y para el transportador de UDP-GlcNAc, obteniéndose así proteínas con glicanos unidos de tipo  $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ , que representan al núcleo de glicosilación en vertebrados (Hamilton et al. 2003).

Posteriormente, los esfuerzos se enfocaron en generar glicanos de tipo complejos y terminados en ácido siálico para aumentar la vida media de la proteína eritropoyetina. Para esto, contando ya con la cepa que expresaba eritropoyetina con glicanos unidos de tipo  $\text{Gal}_2\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ , se sobre-expresaron 5 genes relacionados con la adición de ácido siálico, dentro de los que están enzimas involucradas en la síntesis de ácido siálico, transportadores de éste y glicosil transferasas para la correcta adición del monosacárido. A partir de estas modificaciones se expresó la hormona eritropoyetina humana recombinante con glicanos unidos de tipo complejo y que presentaba actividad biológica en comparación a la expresada en la cepa nativa de *P. pastoris* (Hamilton et al. 2006). Estos trabajos se expandieron a otras cepas de levaduras como *H. polymorpha* y *Y. lipolytica* lo que permite actualmente expresar proteínas de uso terapéutico en estas cepas modificadas como anticuerpos monoclonales, albumina humana e insulina, entre otras (Jiang et al. 2019; Tripathi and Shrivastava 2019)



### **5.3 Expresión de proteínas recombinantes y modificación de la ruta de glicosilación en células de mamíferos.**

Los sistemas descritos anteriormente, presentan diversas limitaciones relacionadas principalmente con las modificaciones post-traduccionales que pueden realizar sobre las proteínas recombinantes y que van en directa relación con la actividad biológica de éstas (Mizukami et al. 2018). Estas modificaciones incluyen el procesamiento proteolítico, la formación de puentes disulfuros, glicosilación,  $\gamma$ -carboxilación,  $\beta$ -hidroxilación, O-sulfatación y amidación (Butler and Spearman 2014).

Las células de mamíferos son el sistema de expresión más utilizado en la actualidad para la producción de biofármacos, ya que poseen la maquinaria metabólica para expresar y secretar proteínas que se asemejan considerablemente a las proteínas humanas superando así las limitaciones de los sistemas descritos anteriormente (Goh and Ng 2018). Para este propósito se utilizan diversas líneas celulares, dentro de estas están las células de ovario de hámster chino (CHO), las células de riñón de hámster bebé (BHK) y dos líneas celulares de ratón: NSO, provenientes de mieloma y SP2-0 provenientes de hibridoma (Barnes et al. Dickson 2000).

Debido a su origen, las líneas celulares humanas también son un sistema de expresión que se utiliza actualmente para obtener proteínas recombinantes de interés terapéutico, ya que disminuyen el riesgo de presentar glicanos que puedan ser inmunogénicos como los obtenidos en otras líneas celulares de

mamíferos no humanas (Barolo et al. 2020). Dentro de las líneas celulares humanas utilizadas como sistema de expresión están HEK-293 y HT-1080, provenientes de riñón humano de embrión y de fibrosarcoma, respectivamente, además de la línea celular PER.C6 provenientes de retina de embrión humano (Chin et al. 2019).

Aun cuando las células humanas se presentan como sistemas con más ventajas que desventajas para la expresión de proteínas recombinantes, lo cierto es que alrededor del 70% de las proteínas recombinantes con aplicaciones farmacológicas se expresan en células CHO modificadas. En estas células se ha sobre-expresado o silenciado la expresión enzimas que contribuyen a obtener proteínas que tengan mayores tiempos de vida media (Wang et al. 2017).

El contenido de ácido siálico que presenten los glicanos influye directamente en el tiempo de vida media de las proteínas en circulación (Goh et al. 2014). En células CHO la unión de ácido siálico en el extremo terminal del oligosacárido ocurre exclusivamente a través de un enlace  $\alpha$ -2,3, mientras que en humanos el ácido siálico se une a través de enlaces  $\alpha$ -2,6 y  $\alpha$ -2,3 (El Mai et al. 2013). Es por esto que se han generado líneas celulares CHO, donde se sobre expresan las enzimas  $\alpha$ -2,6 sialiltransferasa y  $\alpha$ -2,3 sialiltransferasa humanas, observándose un aumento de glicanos terminados en ácido siálico, generando así una mezcla de estructuras  $\alpha$ -2,6 y  $\alpha$ -2,3 enlazadas lo que aumenta los tiempos de vida media de las proteínas (Fischer et al. 2015; Raymond et al. 2015).

Aunque es necesario contar con la enzima que transfiere ácido siálico a la

estructura oligosacáridica, para lograr su modificación efectiva, también es necesaria la presencia de este monosacárido en el aparato de Golgi, por lo que el transporte a través de éste puede ser considerado un paso relevante para la eficacia del proceso de modificación enzimático (Heffner et al. 2018). Para superar este inconveniente se sobre-expresó el transportador de ácido siálico hacia el Golgi (CMP-SAT) de células CHO, así como también la enzima que lo sintetiza (CMP-SA sintasa humana), en conjunto con la expresión de sialiltransferasa humana, observando aumentos de hasta el 43% en estructuras que contienen ácido siálico y una disminución de las estructuras mono-sialiladas presentes en eritropoyetina utilizada como proteína modelo (Jeong et al. 2009; Son et al. 2011).

Otro factor determinante en el tiempo de vida media de las proteínas terapéuticas es el grado de ramificación que presenten las estructuras oligosacáridicas (Takeuchi et al. 1989). En células CHO se observa que para IFN gamma las estructuras oligosacáridicas son principalmente bi-antenarias y terminadas en ácido siálico (Fukuta et al. 2000). Con el fin de lograr un mayor grado de ramificación de estas estructuras se expresaron las enzimas GNT-IV y GNT-V, en conjunto o por separado en estas células, obteniéndose estructuras tri-antenadas cuando se sobre expresan cada una por separado y tetra-antenadas cuando se expresan en conjunto (Park et al. 2012; Yin et al. 2015).

#### **5.4 Expresión de proteínas recombinantes en animales transgénicos.**

Se define como transgénico a un organismo al que se le ha insertado en su genoma un segmento adicional de ADN, ya sea propio o proveniente de otras especies, y dicha modificación se trasmite a su descendencia (Khan 2009). La transferencia del material genético para la generación de animales transgénicos se realiza en etapas iniciales del desarrollo embrionario, lo que favorece el paso de la nueva información genética a la línea germinal del animal (Houdebine 2009).

Por lo general, las proteínas recombinantes producidas en un animal transgénico se expresan en las células de un tejido específico y se secretan a un fluido corporal determinado. La eficiencia del sistema se refleja en la capacidad secretora del tejido y en la facilidad para colectar el fluido al que se vierte la proteína recombinante (Wang et al. 2013). En mamíferos se han expresado proteínas de interés biofarmacéutico en diversos tipos celulares asociados a fluidos corporales específicos. Ejemplos de lo anterior lo constituyen la secreción de anticuerpos humanos recombinantes al fluido sanguíneo de diferentes líneas transgénicas de ratones, conejos, cerdos y ovejas, así como la expresión de  $\alpha$ 1-antitripsina humana biológicamente activa en el hígado de conejos transgénicos (Hunter 2019).

El primer desafío para la expresión de proteínas secretadas a la sangre fue separar la proteína recombinante de su homóloga en el animal, pues las características físico-bioquímicas de estas moléculas se mantienen muy

conservadas entre los vertebrados. Además, las proteínas secretadas al suero sanguíneo resultan poco estables o afectan drásticamente la sobrevivencia del animal transgénico, por lo que esta estrategia se considera como poco idónea para la expresión de proteínas recombinantes con interés biofarmacéutico (Houdebine 2009).

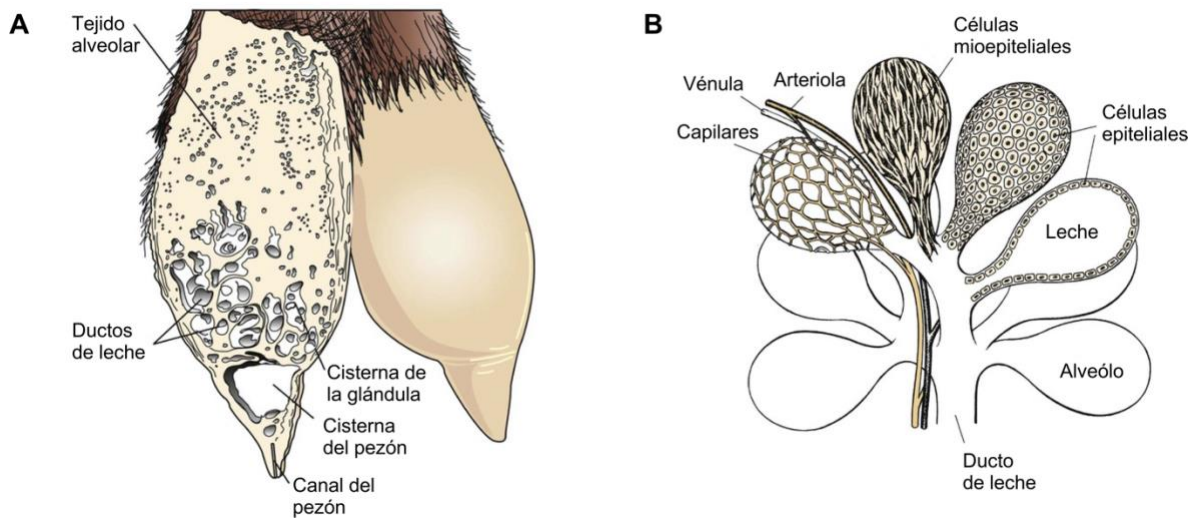
Otros trabajos reportan resultados interesantes sobre la expresión de biofármacos en orina y en plasma seminal (Dyck 1999; Kerr 1998), sin embargo, la glándula mamaria, por su elevada capacidad secretora y su facilidad para la extracción de la leche, es el órgano que presenta mayores ventajas para la producción de proteínas recombinantes. Distintas especies de mamíferos (conejos, cerdos, ovejas, cabras y vacas) son actualmente utilizadas para la expresión de proteínas recombinantes y posterior secreción a la leche (Owczarek et al. 2019). Cabe destacar que actualmente existen 3 biofármacos purificados desde la leche de animales transgénicos y autorizados para su uso en humanos, estos son antitrombina humana, el inhibidor de esterasa humana C1 y recientemente el factor de coagulación humano VII (Chevreux et al. 2017; Walsh 2018).

## **6. La glándula mamaria como sistema de expresión de proteínas recombinantes.**

Desde el punto de vista histológico, la glándula mamaria está compuesta de 2 tejidos: el parénquima y el estroma. El primero corresponde a la parte secretora

de la glándula e incluye a las células epiteliales y mioepiteliales y el segundo corresponde a los componentes no celulares como colágeno y elastina, vasos sanguíneos y el sistema de ductos, entre otros (Lerías et al. 2014). La glándula mamaria se considera una glándula de secreción exocrina - apocrina y su unidad secretora se denomina alveolo (Ramos Moura 2011). Un conjunto de alveolos forma lóbulos los que desembocan en un sistema de ductos, denominados galactóforos, que se van ensanchando hasta llegar al canal del pezón (Peter Li 1999).

Los alveolos se encuentran recubiertos por una capa de células epiteliales que transportan o sintetizan grasas, carbohidratos y proteínas, las que son secretadas el lumen del alveolo y estas células epiteliales se encuentran rodeadas a su vez por una capa de células musculares sensibles al estímulo de la oxitocina. En presencia de esta hormona, las células musculares se contraen y la leche presente en el lumen del alveolo sale al exterior (Montesino and Toledo 2006) (Figura 3).



**Figura 3: Representación de la glándula mamaria de cabra. A:** Exterior de la ubre, **B:** Representación del lóbulo de la glándula mamaria. *Modificado desde Hart et al. 1980 (Cowie, Forsyth, and Hart 1980).*

Las células epiteliales mamarias que recubren el alvéolo integran la unidad de síntesis y secreción. Durante el período de lactancia, estas células epiteliales reciben señales hormonales que activan los promotores de genes que codifican proteínas específicas que son producidas y secretadas al fluido lácteo. Además, a través del epitelio mamario ocurre el transporte de biomoléculas desde la sangre hasta la leche (Clark 1998). Las proteínas secretadas por la glándula mamaria están agrupadas en dos clases, caseínas ( $\alpha$ S1,  $\alpha$ S2,  $\beta$ ,  $\kappa$ ) y proteínas del suero ( $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactoalbumina) (Selvaggi et al. 2014).

En trabajos realizados en la década de los 80, se investigó sobre la capacidad de producción de proteínas recombinantes en la leche de animales transgénicos (Gordon 1987; Simons 1987). Así, los promotores y las regiones regulatorias de los genes específicos de las proteínas de la leche, fueron utilizados para dirigir la

expresión de proteínas en la glándula mamaria como el Activador tisular del plasminógeno (tPA), la hormona de crecimiento humana (hGH), el factor de crecimiento neuronal, la proteína C humana, antitrombina humana (ATh) y lactoferrina humana (Houdebine 2000).

Las distintas especies de mamíferos son filogenéticamente cercanas entre sí y pueden mostrar patrones comunes de glicosilación. Sin embargo, la glicoproteína recombinante Atryn (anti trombina III humana) expresada en la glándula mamaria de cabras, contiene menos ácido siálico que la forma nativa de esta molécula (Edmunds et al. 1998). En forma similar, el inhibidor C1 humano expresado en la glándula mamaria de conejos transgénicos, presenta un patrón de glicosilación que no es totalmente sialilado (Koles et al. 2004). Este problema podría asociarse a que la alta capacidad secretora de la glándula mamaria genera una saturación de la ruta de secreción a través del retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, que no permite que las proteínas expresadas en forma recombinante sean totalmente glicosiladas, (Toledo et al. 2005).

Se ha observado que la expresión de proteínas recombinantes en la leche de animales transgénicos presenta efectos adversos en los animales que las producen, como por ejemplo, la expresión ectópica de las proteínas en diversos tejidos. Aunque las secuencias regulatorias son específicas para la expresión en glándula mamaria, es sabido que este sistema de control no es absoluto, permitiendo la expresión del transgén en muchos otros tejidos. Estos efectos se observaron con eritropoyetina humana (Massoud 1996) y con la hormona del



crecimiento humana (Devinoy 1994). En estos casos, la concentración de la proteína recombinante fue mucho mayor en la sangre de los animales durante la lactación.

### **6.1 Transducción *in situ* de la glándula mamaria de cabras para la expresión de proteínas recombinantes como eritropoyetina humana.**

Una alternativa a la expresión de proteínas recombinantes en la leche de animales transgénicos y que evita la expresión ectópica de los genes, es la transducción *in situ* de la glándula mamaria (Toledo et al. 2005). Este método consiste en una infusión directa del epitelio glandular mamario de una hembra adulta utilizando vectores virales deficientes para la replicación. El procedimiento es simple debido a la morfología de la glándula mamaria que permite una directa comunicación de los ductos alveolares con el canal del pezón. Esto facilita el acceso a las células epiteliales sin la necesidad de un procedimiento quirúrgico o de inyección que son invasivos para los tejidos (Sanchez et al. 2004). La metodología reduce el tiempo de producción de la proteína recombinante desde años a semanas lo que convierte a esta alternativa en un sistema factible de ejecutar en comparación a otras técnicas para la producción de proteínas recombinante (Bosze 2008). Utilizando este sistema de expresión se han obtenido niveles de expresión de proteínas recombinantes que promedian los 1,3 mg/ml, lo que resulta comparativamente superior (entre 5-10 veces) a la expresión en sistemas convencionales de cultivos artificiales de tejidos (Toledo

et al. 2006).

Sin embargo, la expresión recombinante en la glándula mamaria presenta limitaciones en cuanto a la glicosilación cuando se quiere expresar proteínas que poseen un patrón de glicosilación complejo y altamente ramificado como es el caso de la eritropoyetina que, en su forma nativa, como ya se describió anteriormente, posee 1 sitio potencial de O-glicosilación y 3 sitios potenciales de N-glicosilación con un patrón tetra-antenario y tetra-sialilado, lo que aumenta su tiempo de vida media en circulación (Skibeli et al. 2001).

La deficiencia de esta glicoproteína en pacientes con deficiencia renal crónica o fallos renales asociados a traumas, tratamientos farmacológicos intensivos (pacientes con VIH, o quimioterapia) o en pacientes con trasplantes de riñón genera anemia severa. Por tanto, su producción recombinante se ha desarrollado desde los años 90 para ser administrada de forma exógena (Kalantar-Zadeh 2017).

Sin embargo, debido a la complejidad en las modificaciones post-traduccionales de esta molécula, como la N-glicosilación, esta hormona solo se expresa hematopoyéticamente activa en sistemas de cultivos artificiales de células de mamíferos, con su consiguiente alto costo productivo y precios elevados para el paciente (Woodland et al. 2017). En consecuencia, se hace necesaria su producción en sistemas de expresión más simples y/o de menor costo, pero que permitan su expresión en condiciones funcionales.

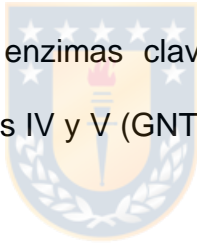
La hormona eritropoyetina expresada de forma recombinante a través de la

transducción *in situ* de la glándula mamaria no mostró actividad hematopoyética, lo que se asocia al patrón de glicosilación de la proteína obtenida por esta metodología ya que en el perfil de N-glicanos se observó que las estructuras más abundantes eran de tipo bi-antenario y mono-sialilado (Toledo et al. 2006; Montesino et al. 2008). Esta disminución en la actividad biológica *in vivo* de la eritropoyetina recombinante se asocia mayoritariamente a la eliminación de la hormona en circulación debido a su interacción con los receptores hepáticos de asialoproteínas (manosa y galactosa), que captan las moléculas de EPO asialiladas (Stockert 1995). Por tanto, la elongación de las cadenas y presencia del monosacárido ácido siálico en el extremo del oligosacárido N-enlazado a EPO resulta determinante para garantizar su retención en circulación sanguínea y permitir su interacción con el receptor en células eritroides.

Otros intentos para aumentar la actividad hematopoyética de eritropoyetina expresada en células de glándula mamaria de cabra estuvieron enfocados a aumentar su tamaño molecular, ya que diversos estudios han demostrado la correlación entre el tamaño molecular de la eritropoyetina y la tasa de eliminación por filtración glomerular (Shi et al. 2013; Schmid 2014). Teniendo en cuenta lo anterior, en nuestro laboratorio se generó una proteína de fusión que contenía la secuencia de la eritropoyetina humana y un fragmento Fc de la IgG humana (EPOFc). Se expresó esta nueva variante de EPOFc en la glándula mamaria de cabras, se purificó y se realizaron ensayos de actividad hematopoyética los que no lograron demostrar actividad biológica de EPOFc. Al analizar el patrón de

glicosilación de esta nueva variante se observó, al igual que en los trabajos anteriores, que posee estructuras de tipo bi-antenario y mono-sialilados lo que se asocia directamente a la actividad hematopoyética (Salgado et al. 2015). Por tanto, la obtención de eritropoyetina con un patrón de glicosilación ramificado y con presencia del monosacárido ácido siálico en el extremo del oligosacárido resulta determinante para garantizar su actividad hematopoyética.

Tomando en cuenta lo anterior, para este trabajo nos propusimos modificar el patrón de glicosilación de la variante EPOFc para lograr estructuras de oligosacáridos tri- y/o tetra-antenarios y con presencia de ácido siálico a través de la sobre expresión de enzimas claves en este proceso como son N-acetilglucosaminiltransferasas IV y V (GNT-IV y GNT-V) y  $\alpha$ -2,6 Sialiltransferasa 1 (ST6N).



## HIPÓTESIS

La expresión recombinante de glicosiltransferasas (N-acetilglucosaminiltransferasas IV y V, y  $\alpha$ -2,6 Sialiltransferasa 1) en células epiteliales de la glándula mamaria de cabra *in vivo*, modifica el patrón de glicosilación de la proteína modelo eritropoyetina humana, generando patrones multi-antenarios y poli-sialilados, que incrementan su actividad hematopoyética *in vivo*.



## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Generar una variante recombinante de eritropoyetina humana expresada en la glándula mamaria de cabras con un patrón de glicosilación incrementado en estructuras multi-antenarias y poli-sialiladas, que potencien significativamente su actividad hematopoyética *in vivo*.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Generar alternativas de co-expresión de EPOFc y glicosiltransferasas utilizando vectores adenovirales como mediadores de la transformación genética.
2. Demostrar la funcionalidad de los diseños de co-expresión de EPOFc con las glicosiltransferasas mediante transducción adenoviral *in situ* de la glándula mamaria de cabras, y analizar los nuevos patrones de glicosilación generados.
3. Evaluar el efecto de modificación en el patrón de glicosilación de la EPOFc co-expresada con glicosiltransferasas en células epiteliales mamaria, mediante ensayos de actividad hematopoyética *in vivo*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Cultivo celular.

Las líneas celulares utilizadas para la amplificación de vectores adenovirales y para la expresión de proteínas recombinantes fueron cultivadas en material plástico específico para este propósito y se mantuvieron en incubadoras de cultivo celular (Nuair, EE.UU.) a 37 °C, humedad relativa del 95 % y ambiente de CO<sub>2</sub> al 5%. Las especificidades de cada línea celular y los medios de cultivo utilizados para cada una se describen a continuación:

#### 1.1 HEK-293A.

Línea celular proveniente de células de riñón de embrión humano (ATCC CRL 1573), generadas a partir de la transformación genética con la región E1 del adenovirus de tipo 5 (Graham et al. 1997). Estas células se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco-BRL, EE. UU) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, 4 mM de L- glutamina, y estreptomycin - penicilina al 1%.

#### 1.2 SiHa.

Línea celular proveniente de cérvix con carcinoma de células escamosas grado II infectado con el virus del papiloma humano variante 16 (VPH-16), (ATCC HTB-35). Estas células se cultivaron en medio DMEM (Gibco-BRL, EE.UU), suplementado con suero bovino fetal al 10%, 4 mM de L- glutamina, estreptomycin-penicilina al 1%.

## **2. Plasmidios.**

### **2.1 pAdtrack-CMV.**

Vector de expresión de 9237 pb utilizado para la expresión de transgenes bajo el control del promotor inmediato temprano del citomegalovirus humano (CMV), además posee una segunda unidad transcripcional bajo el mismo promotor para la proteína fluorescente verde para poder seguir el curso de la expresión (He et al. 1998).

### **2.2 pAdEASY-1.**

Vector de 33 441 pb que contiene el genoma del adenovirus serotipo 5 (Ad5) con deleción de las regiones génicas E1 y E3. Las funciones de E1 se complementan con la línea celular HEK-293A. Además, cuenta con secuencias de recombinación, una unidad transcripcional que confiere resistencia al antibiótico ampicilina (AmpR) y el origen de replicación Ori pBR322.

## **3. Generación de vectores adenovirales.**

La generación de los vectores adenovirales se realizó siguiendo el manual de protocolos del sistema comercial *AdEasy<sup>TM</sup>-Vector System* (Quantum Biotechnologies, EE.UU.). Para este propósito se cumplieron las etapas de: Diseño de las secuencias, subclonamiento de los genes de interés (EPOFc/IRES/GNT-IV; EPOFc /IRES/GNT-V; EPOFc /IRES/ST6N) en el vector de transferencia pAdTrack-CMV, generación de los genomas adenovirales



recombinantes por recombinación homóloga en la cepa bacteriana *BJ5183* y amplificación de éstos en la línea celular HEK-293.

### **3.1 Diseño de las unidades transcripcionales multicistrónicas para Eritropoyetina humana y enzimas de la ruta de glicosilación (EPOFc/IRES/enzimas).**

Las 3 unidades transcripcionales multicistrónicas se diseñaron a partir de la secuencia completa del gen codificante para la glicoproteína Eritropoyetina humana y la secuencia de las enzimas de la ruta de glicosilación (GNT-IV, GNT-V, ST6N) ambas separadas entre sí por un segmento IRES para permitir la expresión de ambos genes bajo el control del mismo promotor en un solo vector. La síntesis del gen diseñado se encargó a la empresa GenScript (EE. UU).

### **3.2 Subclonamiento de EPOFc/IRES/enzimas en vector de transferencia.**

Las secuencias correspondientes a EPOFc/IRES/GNT-V y EPOFc/IRES/ST6N se extrajeron del vector comercial pUC57 utilizando la endonucleasa de restricción *EcoR* V (New England Biolabs, EE.UU.). Por otra parte, la secuencia IRES/GNT-IV se obtuvo desde el vector pAdTrack-EPO/IRES/GNT-IV generado en nuestro laboratorio anteriormente por digestión con las endonucleasas *EcoR* V y *Sma* I. Las bandas de interés se extrajeron desde gel de agarosa al 1% y se purificaron utilizando el kit de extracción de gel GeneJet (ThermoFisher Scientific, K0691). Las bandas purificadas se subclonaron en el vector pAdTrack-EPOFc generado anteriormente en nuestro laboratorio (Salgado y col. 2015) utilizando

las mismas enzimas descritas anteriormente generándose los vectores de transferencia pAdTrack-EPOFc/GNT-IV, pAdTrack-EPOFc/GNT-V y pAdTrack-EPOFc/ST6N. La representación gráfica de los vectores de transferencia y de los geles teóricos se realizaron con el programa SnapGene.

### **3.3 Generación de los genomas adenovirales recombinantes por recombinación homóloga.**

La inserción de los genes de interés en el genoma adenoviral se obtuvo mediante recombinación homóloga en la cepa de *E. coli* BJ5183. Para este propósito, los vectores de transferencia recombinantes descritos anteriormente se digirieron con la endonucleasa de restricción *Pme* I y se co-electroporaron con el plasmidio pAd-EASY-1 (Quantum Biotechnologies, EE.UU.) en la cepa BJ5183. Los genomas adenovirales recombinantes se transformaron en la cepa de *E. coli Top 10* y se purificaron utilizando el kit de purificación de ADN Qiagen Plasmid Midi and Maxi Purification (Qiagen, EE. UU). Así se obtuvieron los genomas pAd-EASY/EPOFc/GNT-IV, pAd-EASY/EPOFc/GNT-V, pAd-EASY/EPOFc/ST6N.

### **3.4 Generación de viriones adenovirales recombinantes.**

Los genomas adenovirales recombinantes se digirieron con la enzima *Pac* I y 10 ug del producto de cada digestión se transfectó las células HEK-293A, previamente crecidas hasta un 70% de confluencia en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (Falcon, EE.UU.) con el reactivo Lipofectin (Invitrogen, EE.UU.). Los cultivos

se mantuvieron en monocapa celular confluyente durante 7 días y la presencia de viriones infectivos se observó por la formación de halos de lisis en el cultivo (Graham and Prevec 1995). Las partículas virales infectivas fueron denominadas AdEPOFc+GNT-IV, AdEPOFc+GNT-V y AdEPOFc+ST6N.

### **3.5 Amplificación de los vectores adenovirales.**

La multiplicación de los viriones AdEPOFc+GNT-IV, AdEPOFc+GNT-V y AdEPOFc+ST6N se realizó en la línea celular HEK293A utilizando 5 partículas virales por célula. Tras 8 h de infección, se reemplazó el medio de cultivo por medio de cultivo sin suero y 48 h post-infección las células se desprendieron suavemente de la placa y se centrifugaron a 100g por 5 min. El precipitado celular se resuspendió en medio de cultivo DMEM sin SBF y se realizaron tres ciclos sucesivos de congelación-descongelación a -20 °C y 37 °C respectivamente, seguido de agitación vigorosa en cada paso. La muestra se centrifugó a 620g durante 10 min y el sobrenadante que contiene los viriones infectivos se almacenó a -80 °C hasta su titulación.

### **3.6 Titulación adenoviral.**

La titulación de las muestras adenovirales se realizó mediante diluciones seriadas en base 5 (40/200) en una placa de 96 pocillos en triplicado. Se tomaron 40 µL de cada una de las diluciones y se transfirieron a una placa de cultivo de 96 pocillos, previamente sembrada con una densidad celular de  $5 \times 10^4$  células

HEK-293A por pocillo. Las células se incubaron a 37 °C, atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y humedad relativa del 95% durante 48 h y transcurrido este tiempo se observó en el microscopio de fluorescencia (OLYMPUS IX81, Japón) las células que expresaban GFP en los pocillos. Se definió como una unidad formadora de color (UFC) a la máxima dilución en la cual se visualizó al menos una célula fluorescente por pocillo. El resultado de estos conteos se promedió y se multiplicó por el factor de dilución para obtener el título viral final, el cual se expresó en UFC/mL.

#### **4. Expresión de las variantes EPOFc en cultivos de células SiHa.**

La expresión de las variantes EPOFc, EPOFc+GNT-IV, AdEPOFc+GNT-V y AdEPOFc+ST6N en cultivos de células SiHa se realizó utilizando 35 partículas virales por célula. Los cultivos se mantuvieron en placas de 100 mm (Falcon, EE.UU.) con medio de cultivo con suero fetal bovino al 10% hasta alcanzar un 80% de confluencia. Antes de realizar la infección, las placas fueron lavadas 3 veces con 3 mL de PBS y posteriormente los cultivos fueron transducidos con medio que contiene los viriones infectivos. Pasadas 8 h, el medio de infección se reemplazó por medio fresco sin suero y se colectó a las 48 h. Antes de almacenarlo a -20°C, se centrifugó a 100 g por 5 min y se filtró en membranas de 0,45 µm para su posterior análisis.

## **5. Detección de la eritropoyetina recombinante**

La electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) se realizó al 10% según Laemmli (Laemmli 1970). Para el análisis de Western blot, las muestras se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher and Schuell, Dassel, Alemania) utilizando el equipo de transferencia Trans-Blot® Turbo™ (Bio-Rad, Irvine CA, EE.UU.). Las distintas variantes de EPOFc se detectaron usando un anticuerpo monoclonal de ratón anti-EPO (Nº catálogo MAB2871-100, R&D Systems, Minneapolis MN, USA) como anticuerpo primario. Como anticuerpos secundarios se utilizaron uno Alexa Fluor® 790 anti-IgG de ratón hecho en burro (Nº catálogo 715-655-150, Jackson ImmunoResearch, West Grove PA, USA) y uno Alexa Fluor® 680 anti-cabra IgG (H+L) hecho en burro (Nº catálogo 705-625-147, Jackson ImmunoResearch, West Grove PA, USA). Las señales infrarrojas se detectaron en el Sistema Odyssey (LI-COR Biosciences, Nebraska, USA).

## **6. Análisis de expresión relativa de ARNm mediante qRT-PCR.**

El ARN total de células SiHa transducidas con los distintos vectores adenovirales mencionados anteriormente se extrajo utilizando el kit NucleoSpin®RNA (Macherey-Nagel, Alemania). La PCR en tiempo real se realizó utilizando el kit Brilliant II SYBR® Green QRT-PCR Master Mix 1-step (Agilent Technologies, 600825) según las indicaciones sugeridas por el fabricante, utilizando 200-400 ng de ARN y 400 nM de partidores por reacción de amplificación. Todos los partidores que se utilizaron y los genes que se analizaron se muestran en la tabla

II. Las condiciones de reacciones fueron 3 min a 95 °C, seguido de 40 repeticiones a 95 °C por 10 s, y 60 °C for 10 s. La cuantificación relativa de la expresión de mRNA se calculó con el método de 2- $\Delta\Delta$ CT (Livak and Schmittgen 2001) y se utilizó como gen normalizador Beta-Actina (ACTB) y Gliceraldehído-3-fostato deshidrogenasa (GAPDH).

**Tabla II: Secuencia de partidores utilizados y genes analizados en los ensayos de qRT-PCR.**

GEN	Secuencia partidores extremo 5'	Secuencia partidores extremo 3'
EPO	CGAAGATCTAGGTACCGCCACCATGG	GGTTCTAGATCATCTATCGCCTGTCC
GNT-IV	GGGTCAAAGTCTGCAACCCG	CGTGTGGAAAAGGGACGGT
GNT-V	CACGAGGAGTTCCGTTGGAT	CCACTGAACGAGTTCACCCA
ST6N	GAGGTGACGGACGACTTCCCGTT	ATCTAAGCACCGCGTCGTGA
ACTB	TGTACCCTGGCATTGCCGACAG	ACGGAGTACTTGCGCTCAGGAG
GAPDH	GACAGTCAGCCGCATCTTCT	GCGCCCAATACGACCAAATC

## 7. Inmunodetección de GNT-IV en células SiHa.

Las células SiHa se sembraron sobre vidrio en placas de 24 pocillos y se cultivaron con medio DMEM suplementado con SFB al 10 % hasta un 70 % de confluencia. Las células fueron transducidas con el vector AdEPOFc o co-transducidas con los vectores AdEPOFc y AdGNT-IV. La expresión de la proteína fluorescente verde (GFP) se visualizó 24 h después de la transducción en microscopio de fluorescencia (Olympus, Tokio, Japón). Las células se fijaron con

paraformaldehído al 4 % durante 20 min. Después de 3 lavados con PBS, se permeabilizaron con 0,1% de Tritón X-100 durante 5 min a temperatura ambiente. El bloqueo se realizó con BSA al 1% durante 1 h. Las muestras se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-RCAS1 D-9 como marcador del aparato de Golgi en un título de 1:200 (Nº de catálogo sc-398052, Santa Cruz Biotechnology, Inc., EE.UU.), y un anticuerpo policlonal anti-GNT-IV 1:200 (Nº de catálogo PA5-31524, Thermo Scientific, USA) como anticuerpos primarios. Como anticuerpos secundarios se utilizaron un anti-ratón rodamina red™-X (RRX) 1:1000 (Nº catálogo 715-295-150, Jackson Immuno Research, USA), y un anticuerpo anti-conejo Alexa Fluor® 647 1:1000 (Nº de catálogo ab150075, Abcam Inc, USA). Las imágenes se adquirieron utilizando el sistema de microscopio confocal LSM780 (Zeiss, Alemania).

### **8. Expresión de eritropoyetina humana en la glándula mamaria de cabra.**

El ensayo de expresión de EPOFc en la glándula mamaria de cabras se realizó según el procedimiento previamente descrito (Sanchez et al. 2004) y se utilizaron 3 hembras de un año de edad y 65 kg de peso en lactancia activa de un mes posparto. Las glándulas mamarias fueron infundidas 2 veces con PBS a través del canal del pezón, hasta completar la máxima capacidad del volumen de la ubre y posteriormente la solución se removió por ordeño manual. Después de dos pasos de lavado, en cada ubre se infundió un volumen de PBS conteniendo una concentración de  $10^9$  partículas virales por mililitro de cada uno de los vectores

adenovirales AdEPOFc/enzima. En el caso de la variante EPOFc+GNT-V+ST6N, se realizó una co-transducción con los 2 vectores adenovirales en el mismo título mencionado anteriormente para cada uno. A partir del día 1 post- transducción se ordeñaron las hembras diariamente hasta el día 8 y las muestras de leche se almacenaron a -20 °C. En todos los ensayos de transducción de la glándula mamaria se consideró cada ubre como una unidad de transducción independiente.

#### **9. Tratamiento de la leche.**

La leche colectada se conservó a -20°C después de cada ordeño. Se tomaron muestras de leche de 50 mL, se diluyeron cinco veces en tampón Tris-CaCl<sub>2</sub> y se centrifugaron a 10621g durante 10 min a 4°C, para separar el suero de la fase grasa. Se obtuvo una fase líquida correspondiente al suero y una capa superior de grasa. El suero se extrajo cuidadosamente con pipeta y se realizó una nueva centrifugación para separar mejor ambas fases. Los sueros obtenidos se conservaron a -20 °C hasta su purificación.

#### **10. Purificación de la eritropoyetina humana desde muestras de leche**

Las muestras de suero de leche se filtraron a través de una membrana de 0,45 µm (Merck-Millipore, Darmstadt, Germany) y se diluyeron 5 veces en tampón de equilibrio (20 mM Tris-HCl, 0,25 M NaCl, pH 7,4). Para la purificación se utilizó el equipo ÄKTA prime Plus, con el software ÄKTA prime view (GE Healthcare,



Danderyd, Suiza). Cada una de las muestras diluídas se aplicaron a una matriz de Proteína-A Sefarosa Fast Flow (GE Healthcare, Chicago, USA) previamente equilibrada con el mismo tampón a un flujo de 0,8 mL/s y se dejó recircular por la matriz 3 veces. Posteriormente, se realizaron 2 lavados sucesivos, uno con 50 mL de tampón de equilibrio hasta observar un aumento en la conductividad y el siguiente con tampón glicina 0,1 M, NaCl 0,25 M, pH 4,8. La proteína se eluyó con tampón glicina 0,1 M, NaCl 0,25 M, pH 3 y se neutralizó con 100 uL de 1 M Tris-HCl, pH 8.0.

En el caso de la variante EPOFc+GNT-IV, se realizó un segundo paso de purificación a través de una matriz de afinidad Blue-Sepharose (1.6 x 120 mm, GE Healthcare, U.S.A.) equilibrada previamente en buffer Tris-HCl 20 mM, Tween-20 1%, pH 7.4. Las muestras se incorporaron a un flujo de 0.4 mL/min. Después de lavar la columna con tres volúmenes de solución de lavado NaCl 0,4 M, y con tres volúmenes de solución de lavado NaCl 0,8 M disueltos en tampón de equilibrio, se realizó la elución con NaCl 2,5 M disuelto en el mismo tampón.

## **11. Análisis del patrón de glicosilación de las variantes de EPOFc expresadas en células epiteliales de glándula mamaria de cabra.**

### **11.1 Desglicosilación de Eritropoyetina con PNGase F.**

La desglicosilación de las distintas variantes de EPOFc se realizó con la enzima PNGase F (New England Biolabs, EE.UU.) de acuerdo a la sugerencia del

fabricante. La proteína se desnaturizó a 70 °C por 10 min en 0,1% SDS y 5% β-mercaptoetanol, se dejó a temperatura ambiente (25 °C) por 20 min y se añadió Nonidet P-40 (NP-40) a una concentración final de 1%. Posteriormente se añadieron 5U de enzima PNGase F por milígramo de glicoproteína y se incubó a 37 °C por 2 horas. La proteína se precipitó con 3 volúmenes de etanol frío y se almacenó a -20 °C por 1 h, seguido de centrifugación a 9410g por 10 minutos. El sobrenadante que contenía los oligosacáridos se secó en centrifuga al vacío (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).



### **11.2 Marcaje de Oligosacáridos.**

Los N-glicanos liberados se marcaron por reacción de aminación reductiva con 5 µL de solución de marcado de 2-aminobenzamida (2-AB) (DMSO: HAc (7:3), 0,35 M 2-AB, 1 M NaCNBH<sub>3</sub>) y se incubaron a 65 °C durante 2 h. La eliminación del exceso de reactivo se realizó utilizando discos de papel filtro Whatman 3MM (Whatman plc, Maidstone, Reino Unido) incorporados en columnas desechables Bio-Rad. Los discos se lavaron con 1 mL de agua miliQ, después con 5 mL de ácido acético al 30% y con 1 mL de acetonitrilo. Posteriormente, se aplicó la muestra con los oligosacáridos marcados en el centro del disco y se dejó por 15 min a temperatura ambiente. La elución se realizó con 1 mL de agua miliQ y se secaron en centrifuga al vacío (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) para su posterior análisis.

### 11.3 Separación de los oligosacáridos marcados con 2-AB por HPLC Fase normal en columna Amida-80.

Los N-glicanos marcados con 2-AB se diluyeron en una mezcla de Formiato de Amonio 100 mM, pH 4,4: Acetonitrilo (35%; 65%) y se centrifugaron a 13500g por 10 min para sedimentar partículas en suspensión. La separación de la población de N-glicanos se realizó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en fase normal (Jasco, Japón) en una columna TSK gel Amida 80 (Tosoh Bioscience, Japón). El método de separación utilizado fue un gradiente de 60 minutos y la fase móvil estuvo compuesta por las soluciones A: Formiato de amonio 50 mM pH 4,4 y B: Acetonitrilo. La detección de los oligosacáridos marcados se realizó mediante fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 330 nm y 420 nm de emisión y los datos fueron adquiridos utilizando el programa ChromPass (Jasco, Japón). El gradiente utilizado se detalla a continuación:

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	Solución A: Formiato de amonio 50 mM pH 4.4 (%)	Solución B: Acetonitrilo (%)
0	0,8	35	65
48	0,8	47	53
49	0,8	100	0
53	0,8	100	0
54	0,8	35	65
60	0,8	35	65

#### **11.4 Asignación preliminar de estructuras de glicanos para perfil obtenido en amida 80.**

Se utilizó un hidrolizado de dextrano correspondiente a una mezcla de oligómeros de glucosa el que se aplicó en la columna descrita anteriormente bajo las mismas condiciones. Cada unidad de glucosa eluyó a un tiempo de retención específico permitiendo graficar unidades de glucosa versus tiempo de retención.

Los valores de tiempos de retención experimentales de las variantes de EPOFc obtenidos se convirtieron en valores de unidades de glucosa (UG) mediante interpolación de los datos con los obtenidos para el estándar. El rango de valores de UG obtenidos por interpolación se ingresó a la glicobase <https://glycostore.org> y se comparó con los valores de UG de las estructuras publicadas.

#### **11.5 Análisis de N-glicanos de EPOFc y sus variantes mediante espectrometría de masa utilizando la técnica de ionización por electronebulización.**

Los oligosacáridos sin marcar se diluyeron en 10 µL de agua y se dializaron en una membrana de Nafion. Después de 2 h, las muestras se diluyeron con un igual volumen de metanol (Merck, Kenilworth NJ, EE.UU.), y se añadió 0,2 µL de una solución 0,5 M de (NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> para favorecer la formación de aductos de fosfato. Los glicanos se analizaron en modo negativo con un espectrómetro de masas de movilidad de iones Waters Synapt G2Si (Waters, Manchester, Reino Unido). Las muestras se infundieron en la fuente de iones del electrospray a través de

capilares de vidrio de borosilicato recubiertos de oro. El ajuste de la fuente de iones fue: voltaje del capilar de ionización de electrospray (ESI) de 1,0-1,2 kV, voltaje del cono 100 V -180 V y temperatura de la fuente de iones 80 °C. La velocidad de la onda T y los voltajes de altura máxima fueron de 450 m/s y 40 V.

### **11.6 Separación de los oligosacáridos marcados con 2 AB por HPLC en columna de intercambio aniónico débil.**

Los N-glicanos marcados con 2-AB se diluyeron en agua ultrapura (MilliQ) y se centrifugaron a 13500g por 10 min. La determinación de especies neutras y cargadas en la población de N-glicanos de los oligosacáridos de las variantes de EPOFc se realizó mediante cromatografía de intercambio aniónico débil (WAX) en la columna Ludger Sep C3 Anion exchange HPLC 7.5 x 75 mm (Ludger, UK). La columna se calibró previamente con los N-glicanos marcados de las proteínas Fetuina bovina (Sigma, U.S.A) y EPO proveniente de células CHO. Ambas proteínas presentan un patrón definido de estructuras neutras y cargadas de tipo mono-, di-, tri- y tetra-sialiladas. El método de separación utilizado fue un gradiente de 90 min con un flujo de 0,4 mL/min y la fase móvil estuvo compuesta por la solución A: 20 % Acetonitrilo y la solución B: 500 mM Formiato de amonio pH 9 en Acetonitrilo al 20%. Los oligosacáridos se detectaron mediante fluorescencia a 330 nm (longitud de onda de excitación) y 420 nm (longitud de emisión).

La asignación del tipo de estructuras presentes en las variantes de EPOFc se realizó por comparación entre los tiempos de retención experimentales y los de las poblaciones estándar. El gradiente utilizado se especifica a continuación:

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	Solución A: 20 % acetonitrilo (%)	Solución B: 500 mM Formiato de amonio pH 9 en Acetonitrilo al 20% (%)
0	0,4	100	0
5	0,4	100	0
21	0,4	96	4
61	0,4	74	26
72	0,4	59	41
77	0,4	51,5	48,5
80	0,4	51,5	48,5
81	0,8	100	0
89	0,8	100	0
90	0,4	100	0

## 12. Ensayos de actividad hematopoyética de las variantes de EPOFc en ratones normocitémicos.

Se utilizaron hembras de ratones normocíticas (*Mus musculus*) de la línea C57BL/6 de 7 semanas de edad, y 30 gr de peso aproximadamente, de acuerdo al método previamente descrito (Toledo et al. 2006). Se generaron grupos experimentales de 6 animales cada uno y se realizaron tres inyecciones, inoculando 88 µg/kg de cada una de las variantes de EPOFc por vía intravenosa por animal, con un intervalo de tres días entre cada inyección (días 0,3 y 6). Se tomaron muestras de sangre en capilar (60 µL aproximadamente) en el día 0 (previo al tratamiento), y en los días 3, 6, 9, 12, 18 y 24 post-tratamiento. El

porcentaje de hematocrito se midió en capilares de vidrio de 70 mm de longitud y 1,55 mm de diámetro utilizando una centrifuga con rotor graduado para hematocrito. Se incluyó en el ensayo un grupo placebo al que se le inoculó PBS y un control negativo que no fue tratado. Los datos fueron analizados usando *two-way* ANOVA.



## RESULTADOS

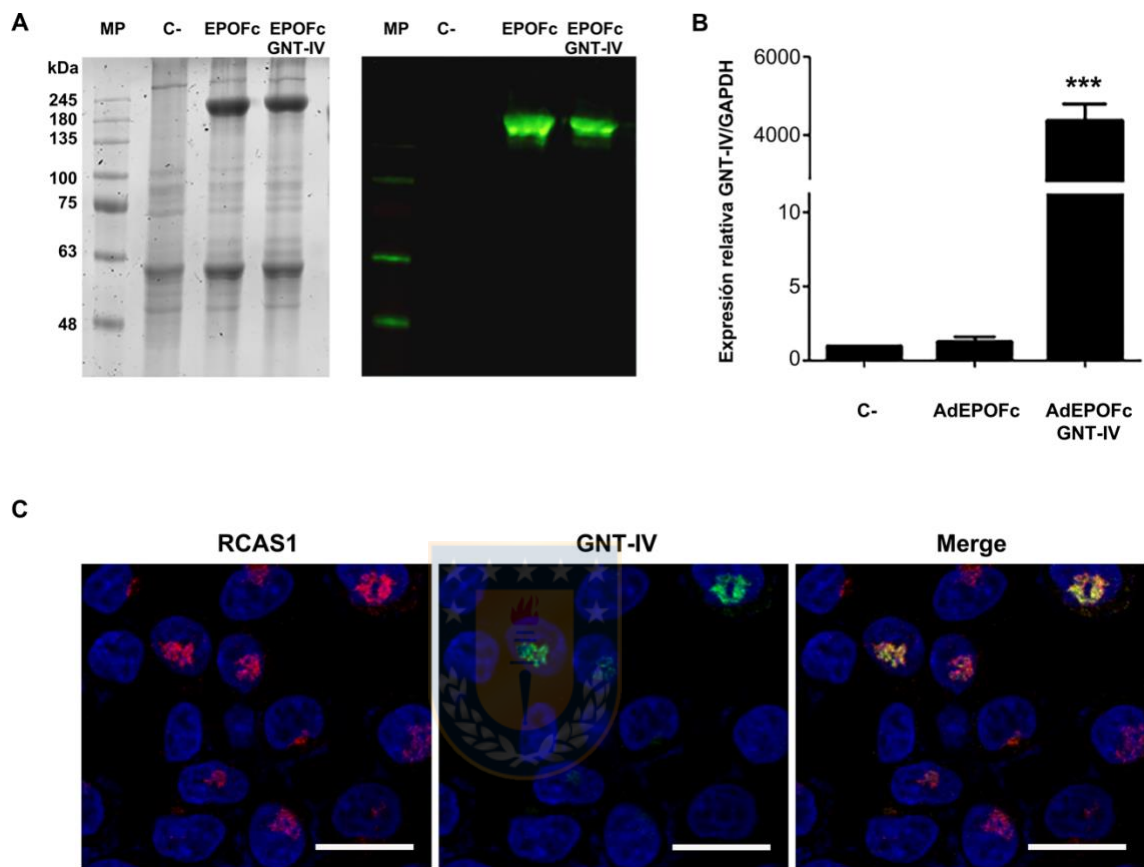
### 1. Expresión de EPOFc y enzima GNT-IV en células SiHa.

Nuestro trabajo se inicia tomando como base los resultados previos obtenidos por nuestro grupo de investigación con la expresión de EPOFc en células epiteliales de glándula mamaria de cabra, donde se observa que la proteína presenta un patrón de glicosilación principalmente bi-antenario y mono-sialilado (Salgado et al. 2015). Dado que este patrón de glicosilación influye directamente en la actividad biológica de la hormona, realizamos como primera aproximación la modificación de la ruta de glicosilación sobre expresando la enzima GNT-IV en conjunto con la proteína EPOFc para obtener estructuras oligosacáridicas con mayor grado de ramificación y lograr así un incremento en la actividad hematopoyética. Se disponía de dos vectores adenovirales, el primero de ellos contiene la secuencia de EPOFc (Ad EPOFc) y el segundo la secuencia de la enzima glicosiltransferasa IV (Ad GNT-IV). Inicialmente se evaluó la funcionalidad de estos vectores mediante una co-transducción en la línea celular SiHa y se analizó la expresión de la proteína EPOFc en el medio de cultivo mediante SDS-PAGE y Western blot en condiciones no reductoras. Se observó una banda sobre los 150 kDa que coincide con la forma dimérica y glicosilada de la molécula, que se secreta al medio de cultivo celular en ambos ensayos de transducción (Figura 4 A). Por otra parte, analizamos la expresión de la enzima GNT-IV mediante qRT-PCR e inmunocitoquímica. En los cultivos transducidos con ambos vectores se



observa un aumento significativo en la expresión del ARN mensajero de la enzima GNT-IV en comparación a la muestra transducida sólo con el vector que contiene la secuencia de la proteína EPOFc (Figura 4 B). Una vez establecida la expresión de GNT-IV a nivel de RNA mensajero, se analizó la expresión y localización subcelular de la enzima mediante inmunocitoquímica de doble marcaje y microscopía confocal en la misma línea celular. Se analizó la co-localización entre la enzima GNT-IV y la proteína RCAS1 como marcador del aparato de Golgi, utilizando anticuerpos específicos para cada una de ellas y se observó que la enzima GNT-IV se expresa intracelular y co-localiza con la proteína RCAS1, que presenta una distribución característica de aparato de Golgi (Figura 4 C).



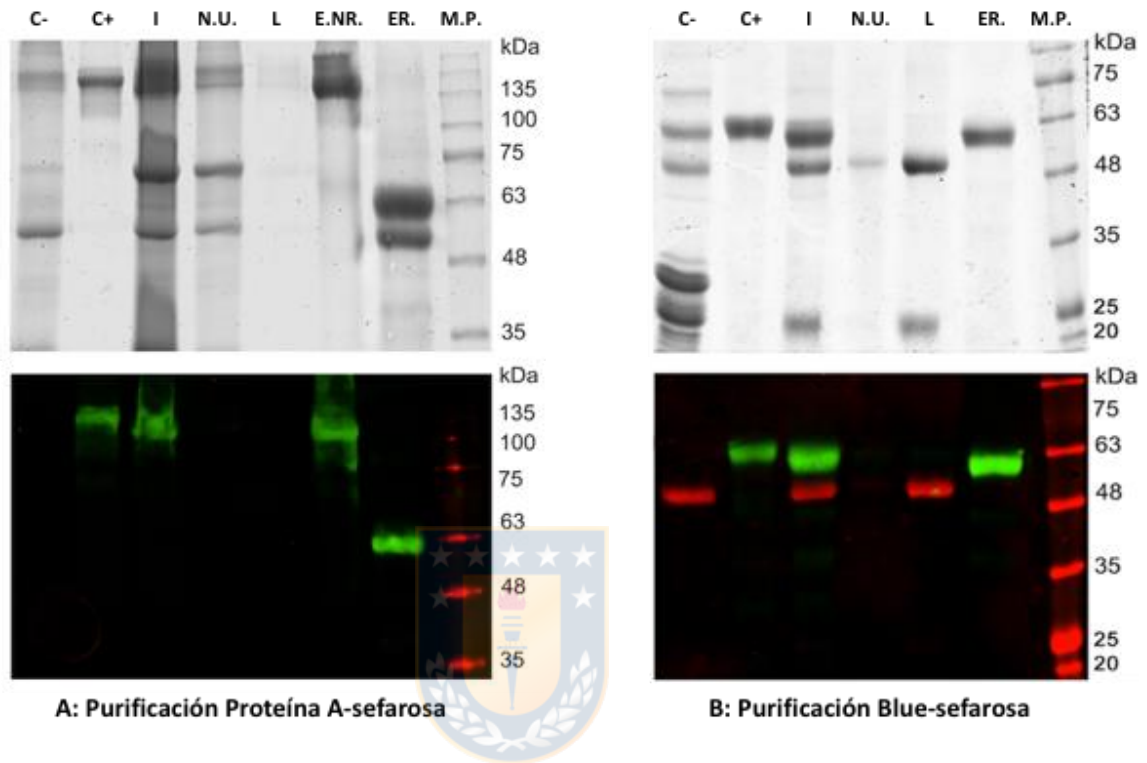


**Figura 4: Análisis de expresión de EPOFc y EPOFc+GNT-IV en cultivos de células SiHa transducidas con los vectores AdEPOFc y AdEPOFc+AdGNT-IV. A:** Evaluación de la expresión de EPOFc mediante SDS-PAGE (izquierda) y Western blot (derecha). Anticuerpo primario: monoclonal anti-EPO (ratón), anticuerpo secundario: anti-IgG de ratón Alexa Fluor® 790 **B:** Análisis de expresión relativa de GNT-IV mediante qRT-PCR. **C:** Inmunodetección de GNT-IV en células SiHa. RCAS1: Detección de la proteína RCAS1 presente en aparato de Golgi, GNT-IV: Detección de la enzima GNT-IV, Merge: Superposición de ambas imágenes. Anticuerpos primarios: anti-RCAS1 D-9 (Aparato de Golgi) y anticuerpo policlonal anti-GNT-IV. Anticuerpos secundarios: anti-ratón rodamina red™-X (RRX) para RCAS1 y Alexa Fluor® 647 para GNT-IV. Las imágenes fueron adquiridas con el Microscopio Confocal Espectral LSM780 NLO, Zeiss (aumento 63x). Escala 21 µm. (Fuente: Elaboración propia).

## **2. Expresión y purificación de EPOFc+GNT-IV en células epiteliales de glándula mamaria de cabra.**

Una vez que se evaluó la expresión de eritropoyetina y de la enzima GNT-IV en células SiHa, se expresaron las variantes EPOFc y EPOFc+GNT-IV en células epiteliales de la glándula mamaria de cabras. Para esto se transdujo la glándula mamaria de cabras lactantes con el vector AdEPOFc o con la combinación AdEPOFc + AdGNT-IV. Se realizó un procedimiento de lavado interno de cada glándula mamaria, infundiéndole PBS estéril a la ubre a través del canal del pezón. Se tomó cada medio de ubre como una “unidad transducible” independiente, y cada una se transdujo con el vector AdEPOFc o con la combinación AdEPOFc + AdGNT-IV, manteniendo la misma concentración de  $10^9$  UFC/mL de cada vector en el inóculo de transducción. Pasadas 24 h del procedimiento, se recolectaron las muestras en la leche desde el día 1 hasta el día 8 y se evaluó la expresión de las variantes de eritropoyetina en el suero de ésta. Se juntaron las fracciones de leche donde se observó una mayor expresión de la proteína y se purificaron las variantes mediante cromatografía de afinidad de Proteína A-Sefarosa para posteriormente analizar las fracciones obtenidas por SDS-PAGE y Western blot (Figura 5). El análisis de la fracción eluída en condiciones reductoras (E.R.) mostró una banda de 63 kDa que se corresponde con el peso molecular esperado para la molécula EPOFc y otra proteína contaminante de menor peso molecular (Figura 5 A). Se realizó un segundo paso cromatográfico con una matriz de afinidad de Blue-Sefarosa garantizando así la purificación por

afinidad a eritropoyetina. Las fracciones obtenidas en este nuevo paso de purificación se analizaron mediante SDS-PAGE y Western blot, incorporando un anticuerpo para detectar la presencia de IgG de cabra (anti cabra Alexa Fluor® 680). Se pudo identificar que la proteína contaminante en la elución de cromatografía de afinidad a Proteína A-Sefarosa corresponde a la IgG de cabra, naturalmente presente en el suero de leche, y que además se une a esta matriz por el mismo principio de afinidad que el fragmento Fc derivado de IgG humana que se encuentra incorporado a la quimera EPOFc. En estas condiciones, se obtuvo la proteína EPOFc con una pureza estimada, superior al 95 % (Figura 5 B). Un procedimiento similar y con iguales resultados se realizó para purificar la variante EPOFc expresada en las células epiteliales de glándula mamaria de cabra transducidas solo con el vector AdEPOFc (datos no mostrados).



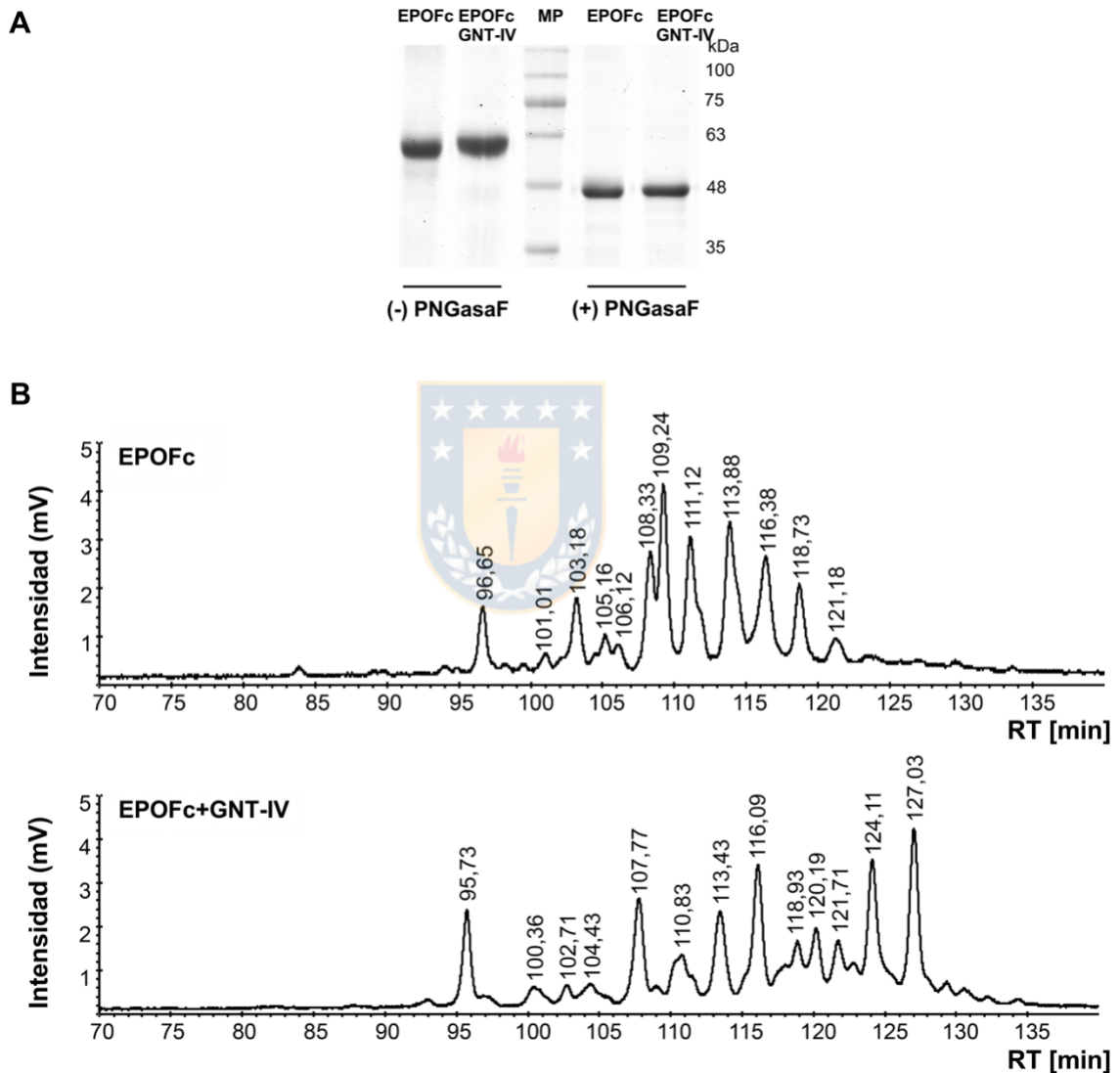
**Figura 5: Purificación de la variante EPOFc+GNT-IV.** **A:** Electroforesis y Western blot de la purificación realizada en matriz de Proteína-A sefarosa. **B:** Electroforesis y Western blot de la purificación realizada en matriz de Blue-sefarosa C-: Control negativo; C+: Control positivo; I: Fracción Inicial; N.U.: Fracción No Unida; L: Lavado; E.N.R: Fracción Elución analizada en condiciones no reductoras, E.R.: Fracción Elución analizada en condiciones reductoras. Anticuerpo primario: monoclonal anti-EPO (ratón), anticuerpo secundario: anti-IgG de ratón Alexa Fluor® 790 y anti-IgG cabra Alexa Fluor® 680 (Fuente: Elaboración propia).

### 3. Análisis del perfil de N-glicanos de las variantes EPOFc por HPLC en fase normal.

Después de obtener las variantes de EPOFc purificadas desde las muestras de leche, se realizó el análisis del perfil de N-glicanos para cada molécula. Los oligosacáridos fueron obtenidos mediante un tratamiento con la endoglicosidasa PNGasa F, que hidroliza la unión entre la Asn y el primer monosacárido GlcNAc de la cadena de N-enlazada a la proteína. Luego de la incubación con PNGasa F las variantes de EPOFc se analizaron en SDS-PAGE (Figura 6 A). Las variantes glicosiladas se identifican en un tamaño cercano a los 63 kDa mientras que las variantes desglicosiladas presentan el mismo tamaño molecular cercano a los 48 kDa. De acuerdo a las diferencias observadas en los tamaños de la proteína con y sin glicanos, se calcula que los oligosacáridos aportan aproximadamente 15 kDa al tamaño final de la proteína lo que corresponde aproximadamente al 24% de la quimera EPOFc.

Las estructuras de N-glicanos se analizaron por HPLC en fase normal en una matriz de Amida-80. Todas las estructuras de N-glicanos de EPOFc eluyeron antes de los 122 min y el *peak* con mayor porcentaje de área bajo la curva se obtuvo a los 109,24 min (18,27% área bajo la curva) (Figura 6 B, panel superior). Los N-glicanos derivados de EPOFc+GNT-IV y separados en las mismas condiciones, mostraron un rango más amplio en cuanto a tiempo de elución. Los *peaks* mayoritarios se obtuvieron en los tiempos de retención de 124,11 min (13,31% área bajo la curva) y 127,03 min (16,69% área bajo la curva) (Figura 6

B, panel inferior). Estos resultados sugieren que la población de N-glicanos enlazados a EPOFc+GNT-IV presentan estructuras más ramificadas en comparación con los N-glicanos de EPOFc.



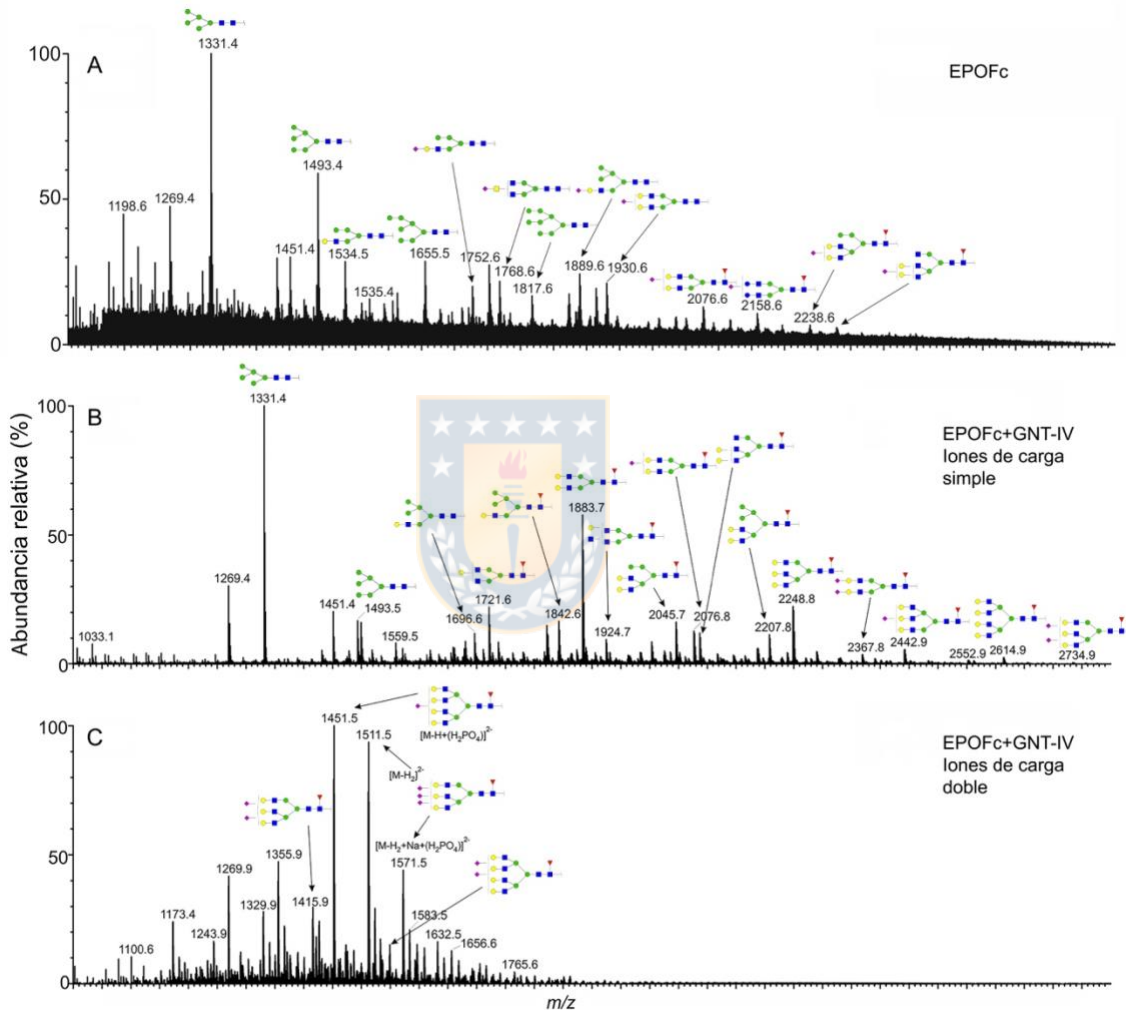
**Figura 6: Análisis del perfil de N-glicanos de las variantes de EPOFc purificadas desde muestra de leche de glándula mamaria de cabra. A:** SDS-PAGE de las variantes tratadas y no tratadas con la enzima PNGaseF y en condiciones reductoras. **B:** Perfil de N-glicanos en columna de Amida-80 en fase normal. Panel superior: Perfil de EPOFc, Panel inferior: Perfil de EPOFc+GNT-IV. (Fuente: Elaboración propia).

#### **4. Análisis del perfil de N-glicanos de las variantes de EPOFc mediante espectrometría de masas.**

El perfil de N-glicanos se obtuvo mediante espectrometría de masas utilizando la técnica de ionización por electronebulización (ESI), donde se registró la formación de los iones de carga simple y doble. Los espectros de masa de EPOFc (Figura 7A) y de EPOFc+GNT-IV (Figura 7 B-C) muestran estructuras de tipo oligomanosídicas, híbridas y complejas que se detallan en la Tabla III de acuerdo a su relación masa/carga. Se observan estructuras oligomanosídicas de desde  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  hasta  $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$  y que están presentes en la mezcla de N-glicanos enlazados a EPOFc, siendo la más abundante  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  (Figura 7A, Tabla III N° 1); mientras que EPOFc+GNT-IV presenta estructuras oligomanosídicas de 5 y 6 manosas ( $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$  y  $\text{Man}_6\text{GlcNAc}_2$ ) (Figura 7B, Tabla III N° 1 y 2). Los oligosacáridos de tipo híbrido neutros y cargados son principalmente mono-antenarios en EPOFc (Tabla III N° 7 y 15) y para EPOFc+GNT-IV se observan estructuras neutras mono- y bi-antenarias (Tabla III N° 6, 8, 14 y 16). Con respecto a las estructuras complejas, en EPOFc, se observan principalmente glicanos de tipo bi-antenario monosialilado (Tabla III N° 9, 11 y 13) y con un porcentaje menor de abundancia una estructura tri-antenaria también monosialilada (Tabla III N° 19). La variante EPOFc+GNT-IV mostró principalmente glicanos de tipo bi-antenario con y sin presencia de ácido siálico (Tabla III N° 10, 12, 13 y 17) siendo la estructura más abundante la bi-antena ( $m/z$  1883.7, Tabla III N° 12). También se observan estructuras tri- y tetra-



antenarias con y sin ácido siálico enlazado (Tabla III N° 18, 20, 21, 23-25). Una de las estructuras complejas que se observa en EPOFc+GNT-IV corresponde a una tri-antena ( $m/z$  2248.8) que no se observa en el espectro de EPOFc.



**Figura 7: Espectros de masa de glicanos N-enlazados a las variantes EPOFc expresadas en células epiteliales de glándula mamaria de la cabra. A:** Espectro de masa ESI de los N-glicanos EPOFc. **B-C:** Espectros de masas ESI de los N-glicanos de carga simple y doble de EPOFc+GNT-IV. La adquisición y el procesamiento de los datos se llevaron a cabo utilizando el programa informático Waters DriftScope (versión 2.8) y MassLynxTM (versión 4.1). La identificación de los peaks se indica en la Tabla III. (Fuente: Elaboración propia)

**Tabla III: Detalle de los peaks identificados en el ensayo de espectrometría de masa.** Se observa la masa monoisotópica, la composición y las estructuras de los N-glicanos aislados de EPOFc y EPOFc+GNT-IV purificadas desde leche de cabra. Nomenclatura de los monosacáridos: ■: N-acetilglucosamina, ●: Manosa, ●: Galactosa, ◆: Ácido siálico, ▲: Fucosa. (Fuente: Elaboración propia).

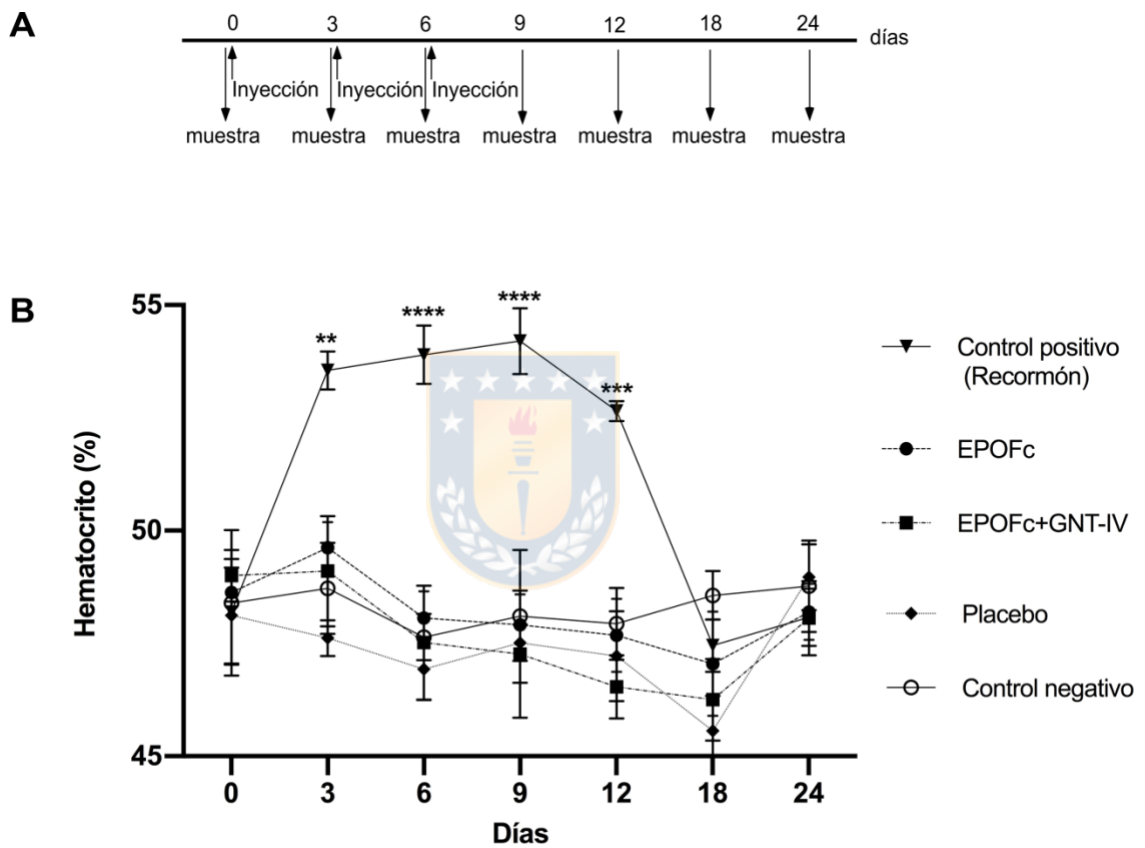
<i>m/z</i>		Composición				Ion <sup>1</sup>	Presente en		Estructura de glicanos
Nº	Calc.	Hex	HexNAc	Fuc	Neu5Ac		EPOFc	EPOFc + GNT-IV	
1	1331.4	5	2	0	0	a	+	+	
2	1493.5	6	2	0	0	a	+	+	
3	1655.5	7	2	0	0	a	+	+	
4	1817.6	8	2	0	0	a	+	+	
5	1534.5	5	3	0	0	a	+	+	
6	1696.6	6	3	0	0	a	-	+	
7	1889.6				1	b	+	+	
8	1842.6	6	3	1	0	a	-	+	
9	1768.6	4	4	0	1	b	+	-	
10	1721.6	4	4	1	0	a	-	+	
11	1930.6	5	4	0	1	b	+	+	
12	1883.7	5	4	1	0	a	-	+	
13	2076.7				1	b	+	+	
14	2045.7	6	4	1	0	a	-	+	
15	2238.8				1	b	+	+	
16	2207.8	7	4	1	0	a	-	+	
17	1924.7	4	5	1	0	a	-	+	

18	2086.7	5	5	1	0	a	-	+	
19	2279.8				1	b	+	+	
20	2248.8	6	5	1	0	a	-	+	
21	2442.9				1	b	-	+	
22	2158.6	3	6	1	1	b	+	+	
23	2614.9	7	6	1	0	a	-	+	
24	1451.5				1	e	-	+	
25	1548.5				2	c	-	+	

1) Iones:  $a = \{M+H_2PO_4\}^-$ ,  $b = [M-H]^-$ ,  $c = \{M-H_2\}^{2-}$ ,  $d = (M-H_3)^{3-}$ ,  $e = [M+(H_2PO_4)-H]^{2-}$

## **5. Ensayo de actividad hematopoyética de las variantes de EPOFc obtenidas.**

Con el fin de observar si el aumento en estructuras tri-antennadas de EPOFc expresada en conjunto con GNT-IV genera un incremento de la actividad hematopoyética *in vivo* de esta proteína, se realizó un ensayo de actividad hematopoyética en ratones normocitémicos. Para esto, se inocularon 3 dosis de 88 ug/Kg de peso de las variantes EPOFc, EPOFc+GNT-IV, control positivo (Recormón<sup>®</sup>, ROCHE, Suiza) y como placebo se administró PBS. Se colectaron muestras de sangre de los animales cada 3 días durante los primeros 12 días y posteriormente cada 6 días hasta completar los 24 días del experimento. Los resultados mostraron que no hay diferencias significativas en cuanto al aumento del porcentaje de hematocrito de la variante EPOFc+GNT-IV con respecto al grupo placebo y que si presenta diferencias significativas en comparación al control positivo utilizado (Figura 5). Si bien EPOFc+GNT-IV tiene una presencia mayor de estructuras tri-antennarias en comparación a EPOFc, esto no fue suficiente para generar un aumento significativo en su actividad biológica



**Figura 8: Ensayo de actividad hematopoyética en ratones normocitémicos. A:** Diseño experimental que señala los días de tratamiento y de toma de muestras **B:** Medición del porcentaje del hematocrito. Valores corresponden al promedio  $\pm$  SEM de hematocrito,  $n=6$ , two way ANOVA, y el test post-análisis de Tukey, de comparaciones múltiples. \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ . Valores de EPOFc+GNT-IV versus control positivo. (Fuente: Elaboración propia).

## **6. Generación de los vectores adenovirales de EPOFc con enzimas glicosiltransferasas.**

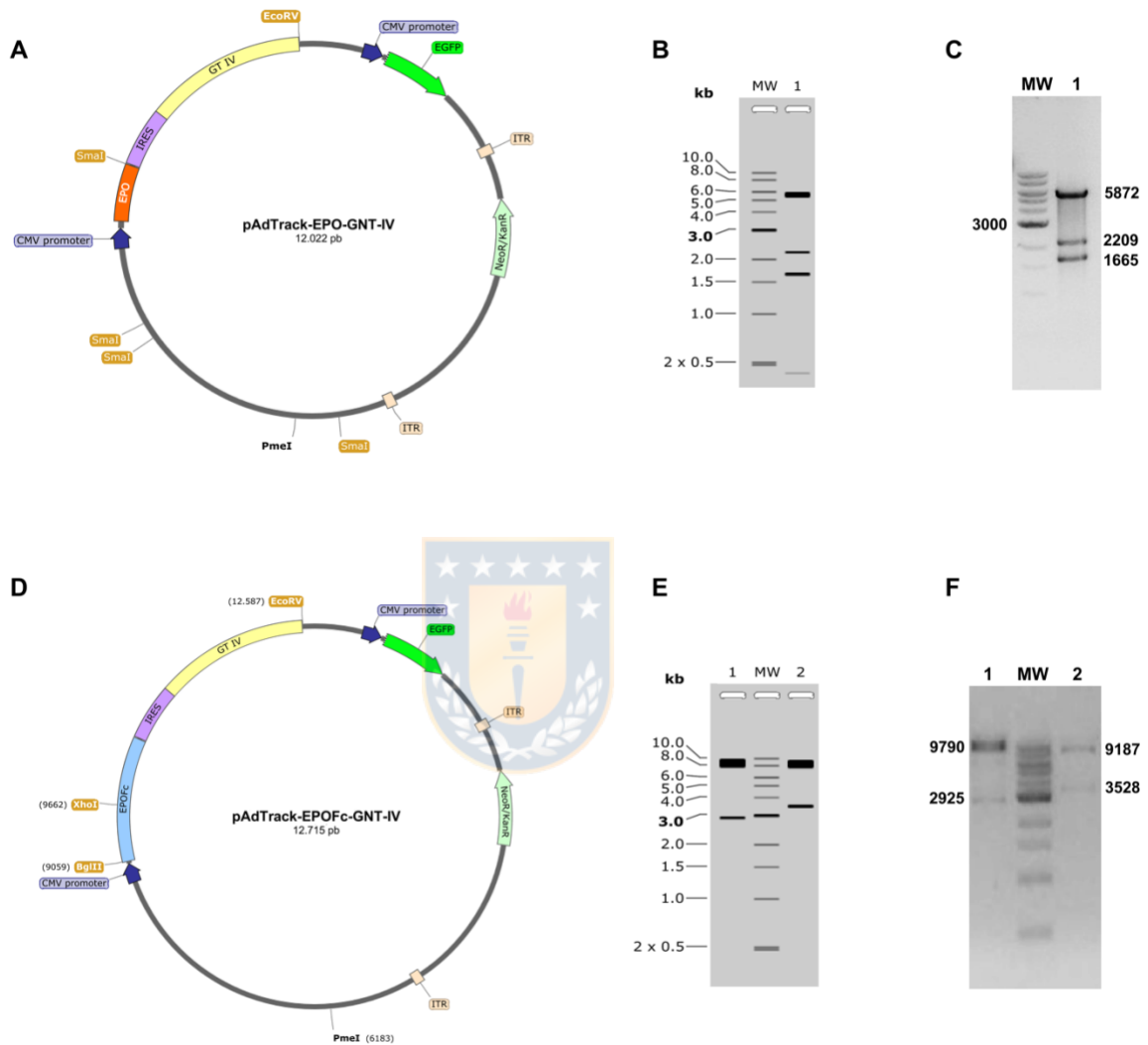
En base a los resultados observados previamente, consideramos que la ausencia de actividad hematopoyética de la variante EPOFc+GNT-IV se puede asociar a una presencia reducida de estructuras oligosacáridicas terminadas en ácido siálico. Este fenómeno se podría explicar por una baja disponibilidad de la enzima  $\alpha$ -2,6 sialiltransferasa 1 (ST6N) que media la incorporación de ácido siálico (Neu5Ac) terminal en los residuos de galactosa de las cadenas de N-glicanos. Para generar estructuras que presenten el residuo Neu5Ac como monosacárido terminal, construimos vectores adenovirales que portaban los genes de EPOFc en conjunto con las enzimas GNT-IV, ST6N y GNT-V, ya que esta última también participa en la generación de estructuras tri-antenadas y nos permite comparar los efectos de estas modificaciones en las distintas variantes generadas.

El primer paso fue generar los vectores de transferencia conteniendo los genes de interés EPOFc y las enzimas descritas anteriormente. Se utilizó el vector pAdTrack-EPOFc reportado anteriormente (Salgado et al. 2015) y a partir de éste plasmidio se construyeron los demás vectores de transferencia.

### **6.1 Construcción del vector de transferencia pAdTrack-EPOFc/GNT-IV.**

El segmento de 2226 pb correspondiente a la secuencia IRES/GNT-IV, se extrajo del plasmidio pAdTrack EPO/ GNT-IV (Figura 9 A) mediante digestión enzimática con las endonucleasas *EcoR V* y *Sma I* (Figura 9 C) y se clonó en el vector de transferencia pAdTrack-EPOFc bajo el control del promotor CMV usando las mismas enzimas de restricción. Como resultado de la clonación se obtuvo el plasmidio denominado pAdTrack-EPOFc/GNT-IV de 12.7 Kb (Figura 9 D).

La correcta inserción del segmento de interés en el vector de transferencia adenoviral se comprobó mediante análisis de restricción con las endonucleasas *EcoR V/Xho I* liberándose los insertos de 9790 y 2925 pb (Figura 9 F carril 1) y también se analizó para la combinación *EcoR V/Bgl II* liberándose los insertos de 9187 y 3528 pb (Figura 9 F, carril 2), ambos patrones de restricción coinciden con el patrón teórico esperado (Figura 9 E, carriles 1 y 2).



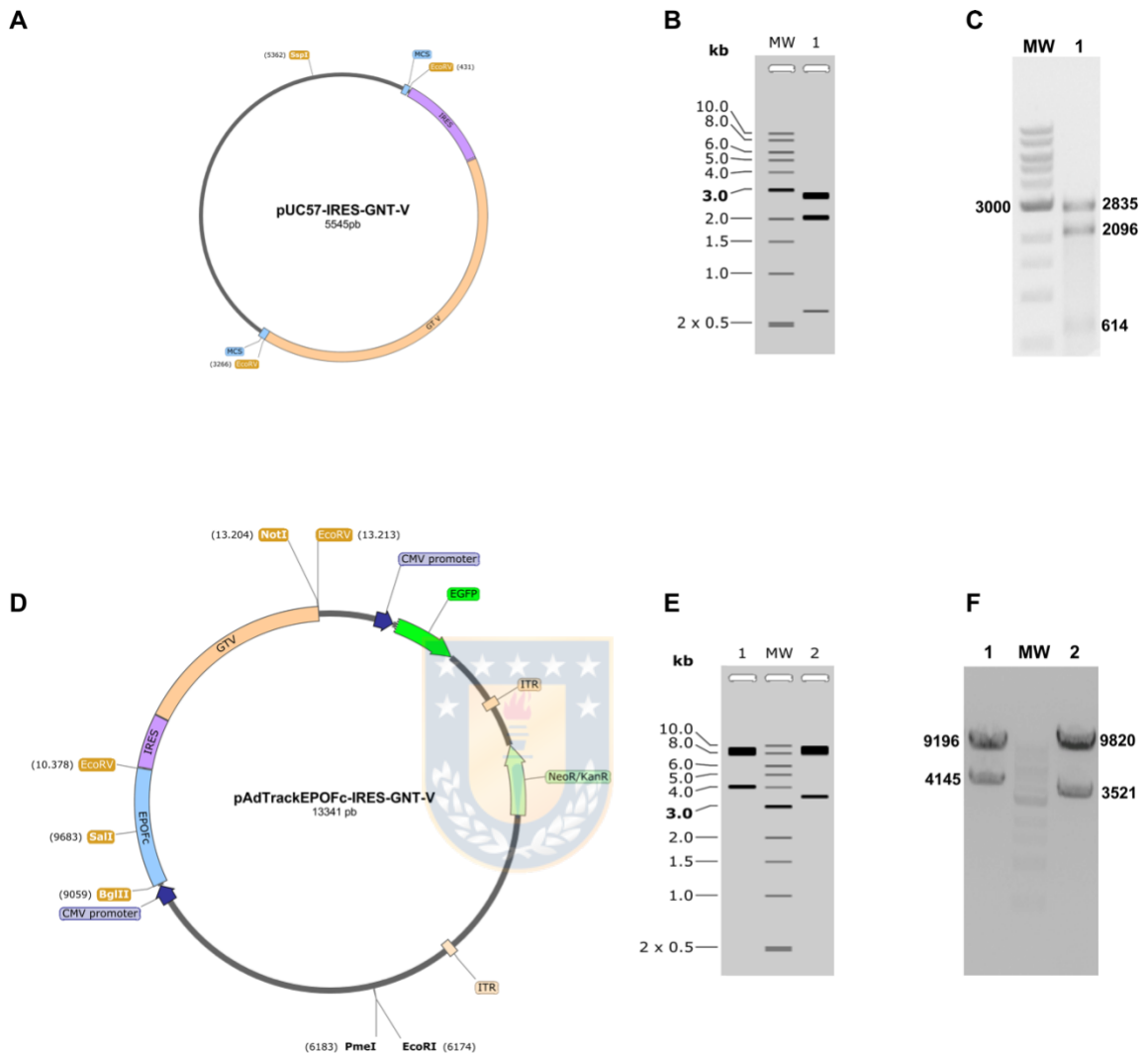
**Figura 9: Construcción del vector de transferencia recombinante pAdTrack-EPOFc/GNT-IV.** **A:** Vector pAdTrack EPO/GNT-IV. **B-C:** Análisis de restricción del plasmidio con las endonucleasas *EcoR V* y *Sma I*, (B) Gel teórico y (C) electroforesis en gel de agarosa al 1%. **D:** Vector pAdTrack-EPOFc/ GNT-IV **E-F:** Análisis de restricción del plasmidio recombinante, (E) Gel teórico y (F) electroforesis en gel de agarosa al 1%. *EcoR V/Xho I* (carril 1) y *EcoR V/Bgl II* (carril 2), MW: Marcador de peso molecular. (Fuente: Elaboración propia)



## 6.2 Construcción del vector de transferencia pAdTrack-EPOFc/GNT-V.

El segmento de 2835 pb correspondiente a la secuencia IRES/GNT-V, se extrajo desde el plasmidio pUC57/IRES/GNT-V (Figura 10 A) mediante digestión enzimática con la endonucleasa *EcoRV* (Figura 10 C), y se insertó en el vector de transferencia pAdTrack-EPOFc, usando la misma enzima de restricción. Como resultado de la clonación se obtuvo el plasmidio denominado pAdTrack-EPOFc/GNT-V de 13.3 Kb (Figura 10 D).

La correcta inserción del segmento de interés en el vector de transferencia se comprobó mediante análisis de restricción con las endonucleasas *Not I* y *Bgl II* liberándose los insertos de 9196 y 4145 pb (Figura 10 F, carril 1) y también se analizó para la combinación *Not I* y *Sal I* liberándose los insertos de 9820 y 3521 pb (Figura 10 F, carril 2), ambos patrones coinciden con el teórico calculado (Figura 10 E carriles 1 y 2).



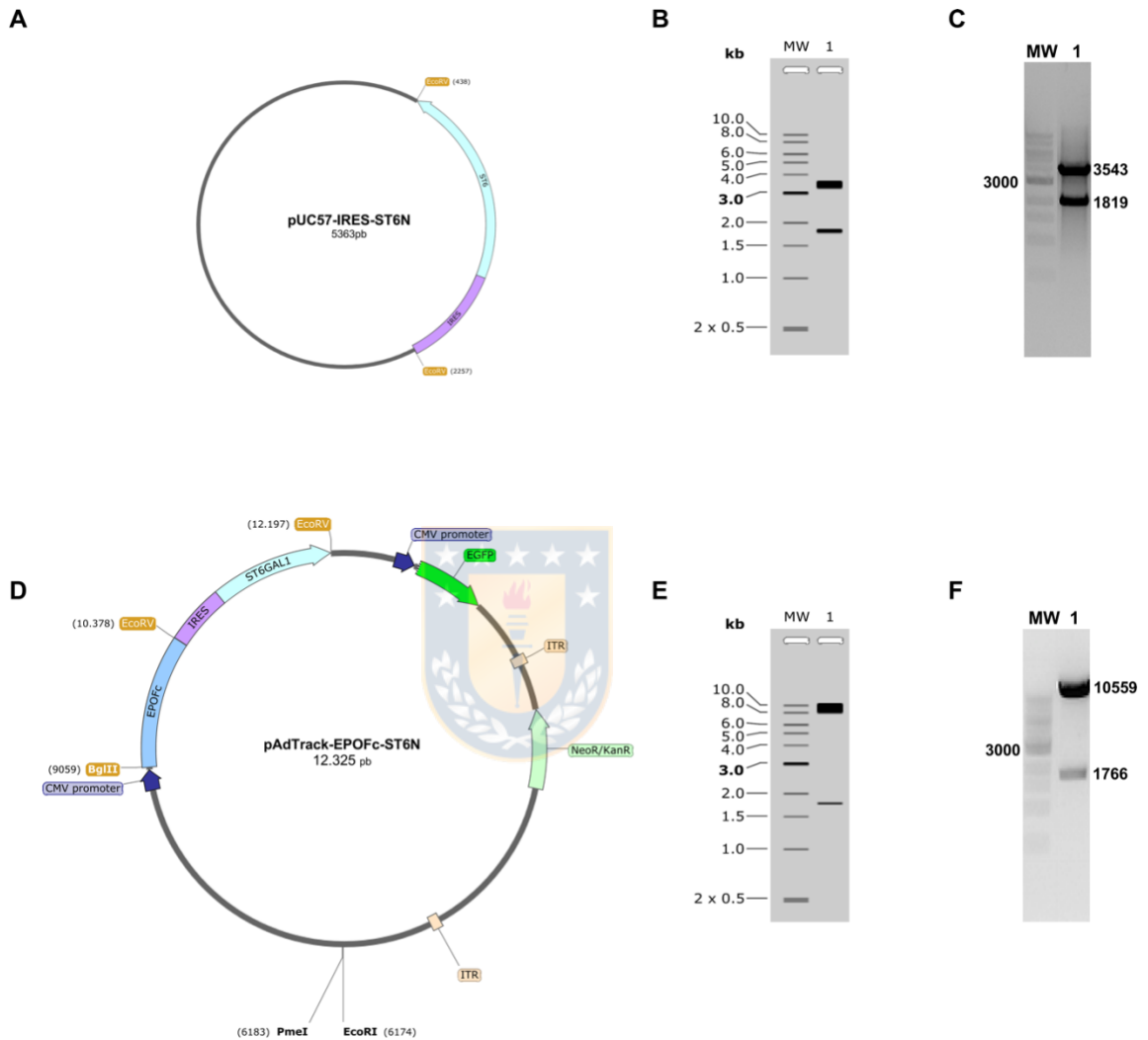
**Figura 10: Construcción del vector de transferencia pAdTrack-EPOFc/GNT-V** **A:** Mapa del vector pUC57/IRES/GNT-V. **B-C:** Análisis de restricción del plasmidio con la endonucleasa *EcoR V* (B) Gel teórico y (C) electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. **D:** Mapa del vector pAdTrack-EPOFc/IRES/GNT-V **E-F:** Análisis de restricción del plasmidio recombinante, (E) Gel teórico y (F) electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio, *Not I* y *Bgl II* (carril 1) y *Not I* y *Sal I* (carril 2), MW: Marcador de peso molecular. (Fuente: Elaboración propia)

### 6.3 Construcción del vector de transferencia pAdTrack-EPOFc/ST6N.

El segmento de 1820 pb correspondiente a la secuencia IRES/ST6N se extrajo del plasmidio pUC57/IRES/ST6N (Figura 11 A) mediante digestión con la endonucleasa *EcoR* V (Figura 11 C), y se clonó en el vector de transferencia pAdTrack-EPOFc usando la misma enzima de restricción. Como resultado de la clonación se obtuvo el plasmidio denominado pAdTrack-EPOFc/ST6N de 12.3 Kb (Figura 11 D).

La correcta inserción del segmento de interés en el vector de transferencia se comprobó mediante análisis de restricción con la enzima *Kpn* I liberándose los insertos de 10559 y 1766 pb (Figura 11 F), lo que coincide con el patrón teórico calculado (Figura 11 E).



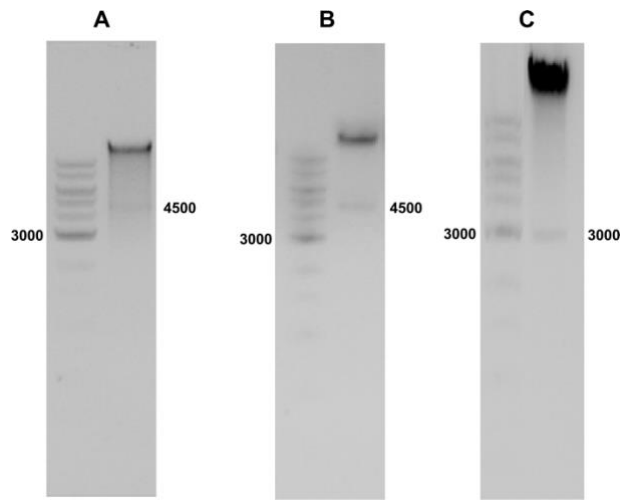


**Figura 11: Construcción del vector de transferencia recombinante pAdTrack-EPOFc/ST6N:** **A:** Mapa del vector pUC57/ IRES/ ST6N. **B-C:** Análisis de restricción del plasmidio con la endonucleasa *EcoR V* (B) Gel teórico y (C) electroforesis en gel de agarosa al 1%, **D:** Mapa del vector recombinante pAdTrack-EPOFc/ST6N. **E-F:** Análisis de restricción del plasmidio con la endonucleasa *Kpn I* (E) Gel teórico y (F) electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio. (Fuente: Elaboración propia)

## 7. Generación de vectores adenovirales.

Los genomas adenovirales recombinantes se generaron a partir de los vectores de transferencia descritos anteriormente, utilizando el sistema de vectores AdEASY (AdEASY™-Vector System, Quantum Biotechnologies, EE. UU). Los plasmidios de transferencia (pAdTrack-EPOFc/GNT-IV, pAdTrack-EPOFc/GNT-V y pAdTrack- EPOFc/ST6N) se co-transformaron con el vector pAd-EASY-1 en la cepa de *E. coli* BJ5183, obteniéndose así el genoma completo de los vectores adenovirales mediante recombinación de segmentos homólogos.

Posteriormente, cada uno de los genomas recombinantes obtenidos se digirieron con la endonucleasa *Pac* I, generándose para los dos primeros (AdEPOFcGNT-IV y AdEPOFcGNT-V) 2 bandas, una de 4.5 kb y otra de 33.54 kb y para AdEPOFc ST6N una banda de 3 kb y otra de 35 kb, lo que coincide con el patrón calculado para confirmar el evento de inserción mediante recombinación homóloga (Figura 12).

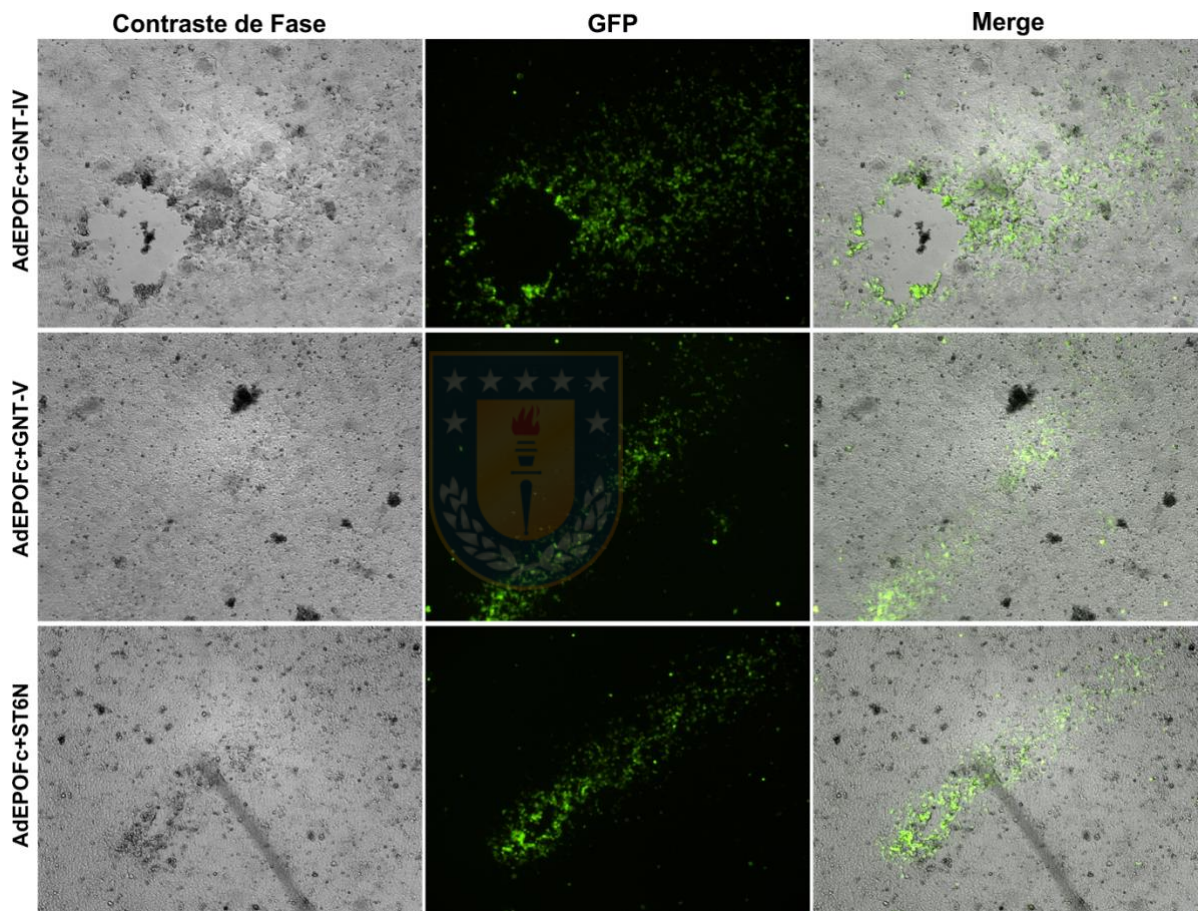


**Figura 12: Digestión de genomas adenovirales recombinantes seleccionados con enzima *Pac* I. A:** Digestión genoma adenoviral AdEPOFc GNT-IV. **B:** Digestión genoma adenoviral AdEPOFc GNT-V. **C:** Digestión genoma adenoviral AdEPOFc ST6N. (Fuente: Elaboración propia)



A continuación, el segmento de mayor tamaño, que corresponde al genoma adenoviral recombinante libre de secuencias bacterianas, se transfectó en la línea de empaquetamiento adenoviral HEK-293A. Estas células aportan “*in trans*” los productos génicos de la región E1, lo que permitió la generación de viriones infectivo denominados AdEPOFcGNT-IV, AdEPOFcGNT-V y AdEPOFcST6N, respectivamente. La eficiencia de la transfección y la formación de halos de lisis, así como el efecto citopático producto de la multiplicación del virus en la línea de empaquetamiento, se monitoreó por la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP) en las células transformadas (Figura 13). Como paso final, los vectores se amplificaron en la línea celular HEK-293A y se obtuvieron títulos

virales de  $2 \times 10^{10}$ ,  $2 \times 10^9$ ,  $2.2 \times 10^9$  UFC/mL respectivamente, a partir de ese material se realizaron todos los ensayos de expresión que se exponen en este trabajo.

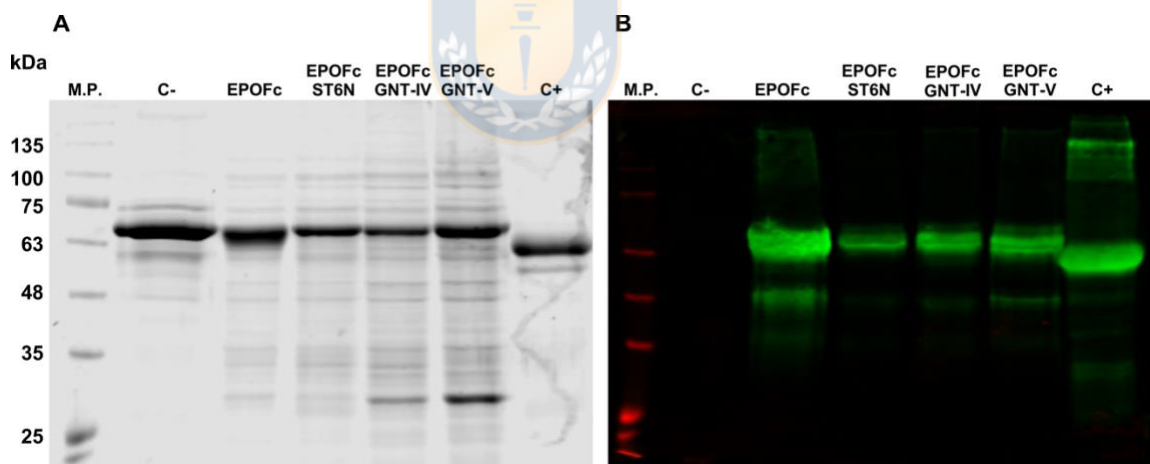


**Figura 13: Generación de los viriones adenovirales** A partir de la transfección de los genomas virales recombinantes en células HEK- 293 se multiplican los viriones infectivos, los que se monitorearon mediante microscopía de fluorescencia (halos de infección -GFP). Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio confocal (Olympus, Japón) con un aumento de 4X y emisión de luz UV (488 nm) (Fuente: Elaboración propia).

## 8. Análisis de la funcionalidad de los vectores adenovirales

### 8.1 Expresión *in vitro* de las variantes EPOFc en células SiHa.

Para comprobar la funcionalidad de los vectores adenovirales, se expresaron las distintas variantes de EPOFc en cultivos de células SiHa transducidos con los correspondientes vectores adenovirales. Se utilizaron 35 partículas virales por célula y 48 h post transducción se evaluó la presencia de la proteína en el medio de cultivo por Western blot en condiciones reductoras para todas las variantes de EPOFc descritas anteriormente. Para todas las variantes analizadas se observó una banda de 65 kDa aproximadamente (Figura 14 B). El contenido de proteínas totales de la muestra se analizó mediante electroforesis (Figura 14A).

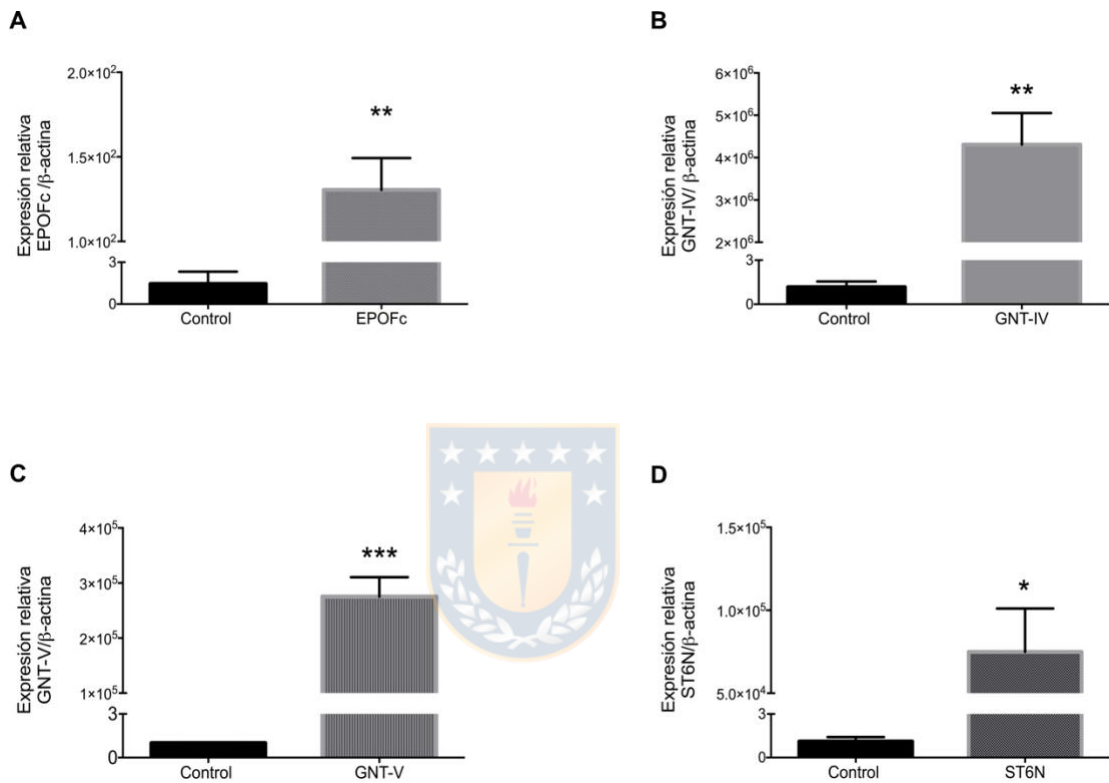


**Figura 14: Expresión *in vitro* de las variantes de EPOFc en cultivos de células SiHa.** **A:** SDS-PAGE de las muestras analizadas. **B:** Western blot de las muestras analizadas. Los carriles de izquierda a derecha son: M.P.: Marcador de peso molecular, C-: Control negativo, EPOFc: Eritropoyetina expresada sin modificación, EPOFc+ST6N: Eritropoyetina con la enzima ST6N, EPOFc+ GNT-IV: Eritropoyetina con la enzima GNT-IV. EPOFc+ GNT-V: Eritropoyetina con la enzima GNT-V. C+: Control de EPOFc obtenida en leche de cabras. (Fuente: Elaboración propia). Anticuerpo primario: monoclonal anti-EPO (ratón), anticuerpo secundario: anti-IgG de ratón Alexa Fluor® 790.



## **8.2. Análisis de la expresión de las enzimas GNT-IV, GNT-V y ST6N mediante qRT-PCR.**

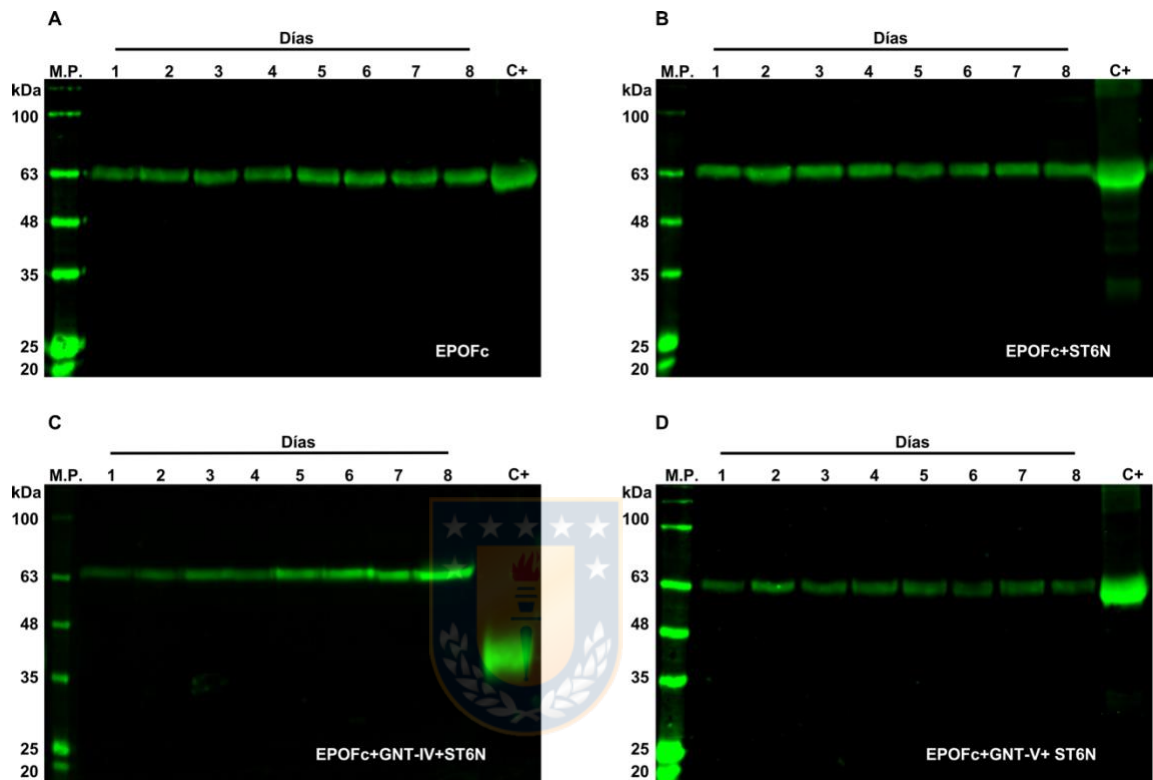
Una vez que observamos que la proteína de interés se secretaba al medio de cultivo, analizamos la expresión de las enzimas GNT-IV, GNT-V y ST6N en las células SiHa mediante qRT-PCR. Pasadas 48 h posteriores a la transducción se realizó la extracción del RNA total y la síntesis de cDNA correspondientes. Utilizando como templado las muestras de cDNA generadas, se realizaron análisis de qRT-PCR con partidores específicos para cada una de estas enzimas y además se observó la expresión relativa de EPOFc. Como control se utilizaron células no transducidas. Para todas las enzimas analizadas se observa un aumento significativo en la expresión relativa en comparación al control, lo que nos permite sugerir que tanto la proteína EPOFc como las enzimas correspondientes se expresan intracelularmente (Figura 15).



**Figura 15: Análisis de la expresión relativa de EPO, GNT-IV, GNT-V y ST6N mediante qRT-PCR. A:** Expresión relativa de EPOFc. **B:** Expresión relativa de GNT-IV. **C:** Expresión relativa de GNT-V. **D:** Expresión relativa de ST6N. Las gráficas corresponden a los valores promedio ± SEM, n=3, usando análisis t test de una cola. \*: p<0.05, \*\*: p < 0.01, \*\*\*: p < 0.001 (Fuente: Elaboración propia.)

## 9. Expresión de las variantes de EPOFc en células epiteliales de glándula mamaria de cabra.

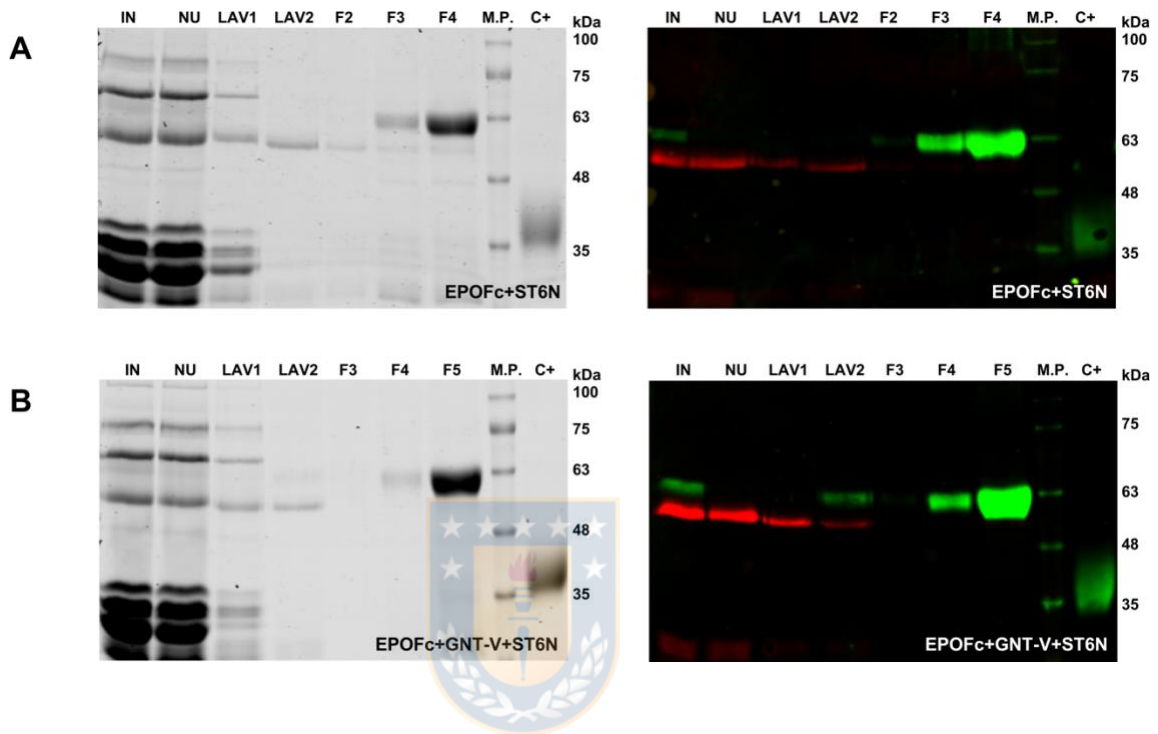
A partir de que corroboramos *in vitro* la expresión de EPOFc y de los genes de las glicoenzimas descritas, utilizamos los vectores adenovirales generados para co-expresar las proteínas de interés en células epiteliales de la glándula mamaria de cabras mediante transducción adenoviral. Se realizaron transducciones con el vector AdEPOFc-ST6N por sí solo y en conjunto los vectores AdEPOFcGNT-IV + AdEPOFc ST6N y AdEPOFcGNT-V + AdEPOFc ST6N. Para cada ensayo de transducción adenoviral *in situ* se utilizó un título final de  $1 \times 10^9$  UFC/ml y 24 h posteriores a la transducción se inició la recolección de la leche por un periodo de 8 días para analizar la presencia de la proteína en este fluido. Las variantes obtenidas fueron: EPOFc+GNT-IV+ST6N, EPOFc+GNT-V+ST6N y EPOFc+ST6N, además de EPOFc como control. En todas las variantes analizadas por Western blot en condiciones reductoras se observó una banda de aproximadamente 63 kDa correspondientes a la proteína eritropoyetina con un fragmento Fc (Figura 16).



**Figura 16: Análisis de la expresión de las variantes EPOFc en células epiteliales de glándula mamaria de cabra por Western blot.** **A:** Expresión de EPOFc. **B:** Expresión de EPOFc+ST6N. **C:** Expresión de EPOFc+GNT-IV+ST6N. **D:** Expresión de EPOFc+GNT-V+ST6N. M.P.: Marcador de peso molecular, 1-8: Días de toma de muestra y análisis, C+: EPOFc expresada en células epiteliales de glándula mamaria de cabras (A, B y D), C+: EPOFc expresada en cultivos de células CHO (C). Anticuerpo primario: monoclonal anti-EPO (ratón), anticuerpo secundario: anti-IgG de ratón Alexa Fluor® 680 (Fuente: Elaboración propia).

## **10. Purificación de las variantes de EPOFc obtenidas desde células epiteliales de glándula mamaria de cabra.**

Una vez comprobada la expresión de las proteínas en el suero de leche, se juntaron las muestras obtenidas. La leche se trató con buffer Tris-CaCl<sub>2</sub> y el suero obtenido de este proceso se purificó mediante cromatografía de afinidad a una matriz de proteína A-Sefarosa. Al analizar las distintas fracciones generadas en la purificación por SDS-PAGE y por Western blot en condiciones reductoras, se observó que la proteína EPOFc eluyó desde la fracción 3 hasta la fracción 5 (Figura 17). En el análisis por Western blot de las fracciones iniciales se observa la presencia de 3 bandas, la primera cercana a los 63 kDa correspondiente a EPOFc y 2 bandas: una de aproximadamente 50 kDa correspondientes a la cadena pesada y otra de 25 kDa correspondiente a la cadena liviana de IgG nativa de cabra presente en el suero de leche. Una parte de las IgG de cabra presentes en la muestra no se retiene en la columna y se identificó en la fracción no unida, el resto eluyó en los lavados debido a la menor interacción de afinidad entre la IgG de cabra y la matriz de Proteína A-Sefarosa.



**Figura 17: Purificación de las variantes de EPOFc en matriz Proteína A-Sefarosa.** En el panel izquierdo se observa la electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% teñido con azul de Coomasie y en el panel derecho el Western blot de las fracciones analizadas, ambos en condiciones reductoras. **A:** EPOFc+ST6N, **B:** EPOFc+GNT-V+ST6N. Las fracciones representadas en cada carril son las siguientes: IN: Material Inicial; NU: Proteínas No Unidas; LAV1: Lavado con tampón de equilibrio; LAV2: Lavado con Tampón Glicina 0,1M, NaCl 0,25M, pH 4.8; F3, F4 y F5: Fracciones Eluidas con tampón de Elución pH 3; M.P.: Marcador de peso; C+: EPO expresada en cultivos de células CHO). Anticuerpo primario: monoclonal anti-EPO (ratón), anticuerpo secundario: anti-IgG de ratón Alexa Fluor® 790 y anti-IgG cabra Alexa Fluor® 680 (Fuente: Elaboración propia)

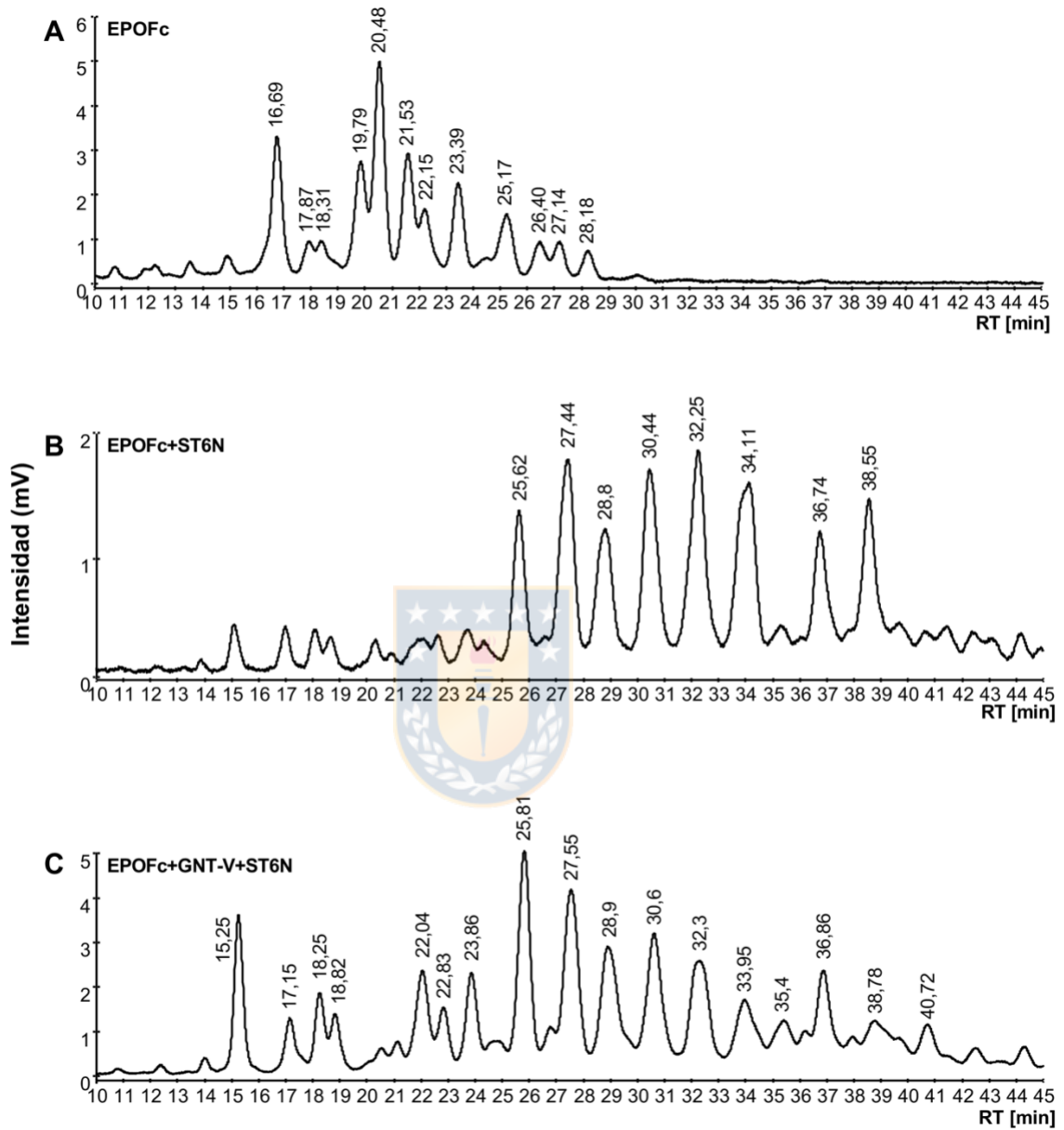
## **11. Análisis del patrón de N-glicanos de las variantes de EPOFc obtenidas desde glándula mamaria de cabra por HPLC.**

### **11.1 Análisis del perfil de N-glicanos de las variantes de EPOFc mediante HPLC Fase normal en columna de Amida-80.**

Una vez purificadas las proteínas a partir de las muestras de leche, se analizó el patrón de N-glicosilación de las variantes de EPOFc para identificar diferencias respecto de la proteína expresada como control (EPOFc) y en conjunto con las enzimas descritas anteriormente. Se analizó la mezcla total de N-glicanos mediante NP-HPLC en matriz de Amida-80, para esto, los N-glicanos fueron liberados utilizando la enzima PNGasa F y posteriormente marcados con 2-aminobenzamida (2-AB) para ser detectados mediante emisión de fluorescencia a 420 nm. En el perfil generado para EPOFc utilizada como control la mayoría de los glicanos eluyen a bajos tiempos de retención (Figura 18 A). Una asignación preliminar de estructuras utilizando un marcador de dextrano hidrolizado muestra que los glicanos serían, principalmente, de estructura di-antenaria y en algunos casos pueden tener presente 1 ácido siálico (Tabla III). La estructura que presenta el mayor porcentaje de área (19,79%) es la asociada al *peak* 4, que correspondería a una bi-antena. En el caso de EPOFc expresada en conjunto con la enzima ST6N (Figura 18 B), se observó que las estructuras de glicanos eluyen a tiempos de retención mayores en comparación al control EPOFc. Al realizar una asignación preliminar de las posibles estructuras encontradas, se

observa que principalmente serían de tipo di- y tri-antena y con presencia de 1 ó 2 ácidos sálicos (Tabla III *peaks* 9, 11, 12-15, 17 y 18). En el caso de la variante de EPOFc expresada en conjunto con la combinación de enzimas GNT-V+ST6N (Figura 18 C), se observó una mayor heterogeneidad en el tipo de estructuras de glicanos. La asignación preliminar de estructuras muestra la presencia de glicanos de tipo mono-, di-, tri- y en menor grado de tetra-antenas (Tabla III *peaks* 1, 2, 5, 6, 11-19). Además, algunas de esas estructuras podrían tener presencia de 1 ó 2 ácidos sálicos. En esta mezcla de oligosacáridos, un porcentaje del 2,6 % podría corresponder a estructuras de tipo tetra- antenarias y con terminaciones en ácido siálico (Figura 18 C, *peak* 19). Estos resultados demuestran, parcialmente, que la sobre expresión de las enzimas GNT-V y ST6N ya sea en conjunto o por separado, modifican el patrón de glicosilación de la proteína expresada favoreciendo la generación de estructuras de mayor tamaño que eluyen a mayores tiempos de retención.

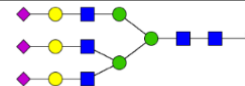

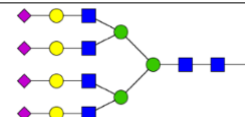




**Figura 18: Perfiles de N-glicanos generados mediante HPLC en fase normal en matriz de Amida-80 de variantes de EPOFc purificadas desde leche cabras. A:** Perfil EPOFc control. **B:** Perfil EPOFc+ST6N. **C:** Perfil EPOFc+GNTV+ST6N. (Fuente: Elaboración propia).

**Tabla IV: Detalle de las estructuras oligosacáridicas probables identificadas mediante la asignación de Unidades de Glucosa.** Se observan los tiempos de retención, UG calculado, UG teórico obtenido desde glicobase, el porcentaje de cada estructura y la composición de los posibles N-glicanos aislados de EPOFc, EPOFc+ST6N y EPOFc+GNT-V+ST6N purificadas desde leche de cabra. Monosacáridos: ■:N-acetilglucosamina, ●: Manosa, ●:Galactosa, ◆:Ácido siálico, ▲: Fucosa. (Fuente: Elaboración propia).

Nº	Tiempo Retención (RT min)	UG calculado	UG teórico	Área (%)			Estructuras de oligosacáridos probables
				EPOFc	EPOFc +ST6N	EPOFc + GNT-V+ST6N	
1	15,25	5,13	5,15			6,89	
2	16,69	5,47	5,4	14,72			
	17,15	5,58				2,86	
3	19,79	6,18	6,12	11,41			
4	20,48	6,34	6,35	19,79			
5	21,53	6,58	6,6	12,4			
	22,04	6,67				5,17	
6	22,15	6,70	6,72	6,96			
	22,83	6,84				2,53	
7	23,39	6,97	6,94	9,42			
	23,86	7,07				4,45	
8	25,17	7,35	7,36	7,69			
9	25,62	7,44	7,41		9,36		
	25,81	7,49		11,5			
10	26,4	7,61	7,67	3,91			
	27,14	7,77		3,58			
	27,44	7,83			15,34		
11	27,55	7,85	7,8			11,39	
	28,18	7,99		2,58			
	28,81	8,12			10,53		
12	28,91	8,14	8,13			9,46	
	30,44	8,48			14,15		
	30,61	8,51		8,42		9,06	
13	32,25	8,87	8,86		16,21		
	32,31	8,88			8,60		
14	33,95	9,24	9,27			5,53	
	34,11	9,28			15,61		
15	35,4	9,57	9,53			3,46	

17	36,74	9,87	9,82		7,59	6,08	
	36,86	9,89					
18	38,55	10,28	10,32		11,19	4,3	
	38,78	10,34					
19	40,72	10,79	10,88			2,63	

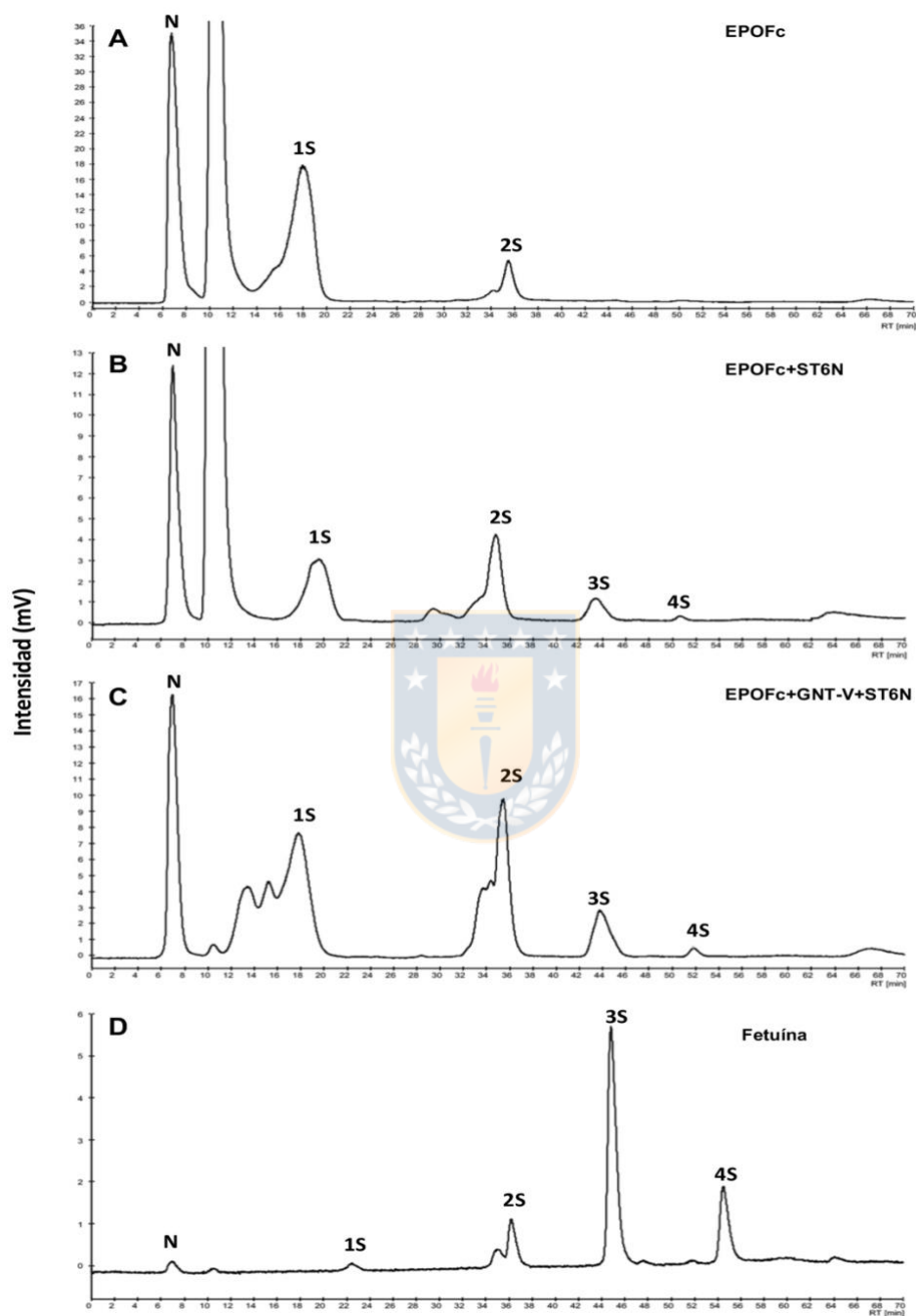
## 11.2 Análisis de la presencia de estructuras cargadas en la mezcla de N-glicanos mediante cromatografía de intercambio débil.

Considerando que una de las enzimas expresadas en conjunto con EPOFc fue la ST6N, que cataliza la transferencia de ácido siálico a un residuo de galactosa, evaluamos la presencia de estructuras cargadas mediante cromatografía de intercambio débil (*Weak Anion Exchange*). Para la identificación de las estructuras, se utilizó como referencia la proteína fetuína que posee un patrón de estructuras cargadas definido (Figura 19 D). El análisis muestra que EPOFc utilizada como control, presenta principalmente, estructuras de tipo neutras (41,8 %), mono- (50,51%) y di-sialiladas (7,69%) (Tabla V, Figura 19 A), mientras que la variante EPOFc+ST6N presenta un porcentaje de estructuras de tipo neutra del 41,21%, una disminución en las estructuras mono-sialiladas (26,94 %) en comparación al control y un aumento en las estructuras de tipo di-sialiladas (24,66%). También se observa la presencia de estructuras de tipo tri y tetra-sialiladas, en menor porcentaje (6,58% y 0,61% respectivamente) (Tabla V,

Figura 19 B). La variante EPOFc+GNT-V+ST6N presenta 21,3 % de estructuras de tipo neutras, un 44,53% de estructuras mono-sialiladas, y un 26,87% de estructuras di-sialiladas, porcentaje similar al observado en la variante EPOFc+ST6N. Además, se observa un 6,64% y 0,66% de estructuras tri- y tetra-sialiladas, respectivamente (Tabla V, Figura 19 C). La Tabla V resume el porcentaje total de cada tipo de estructura en las distintas variantes.

**Tabla V: Porcentajes de estructuras cargadas presentes en EPOFc y las variantes EPOFc modificadas.**

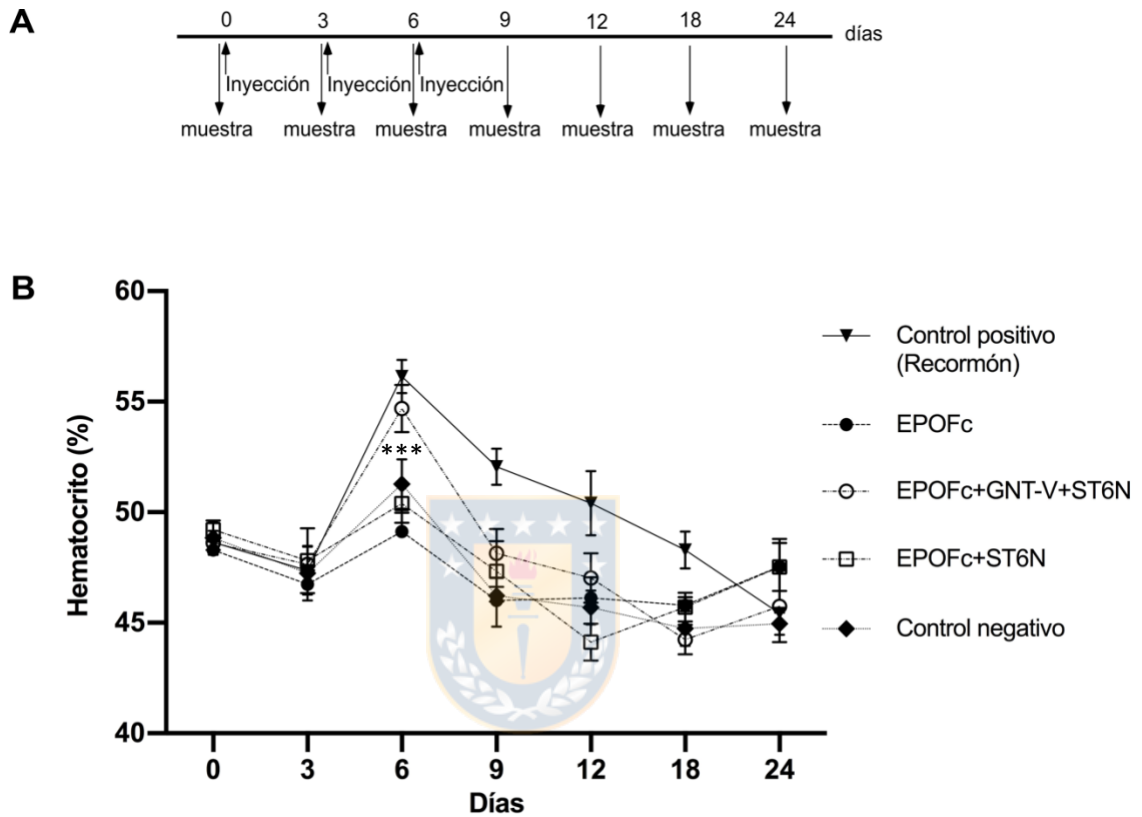
	Neutras (%)	Mono-sialiladas (%)	Di-sialiladas (%)	Tri-sialiladas (%)	Tetra-sialiladas (%)
EPOFc	41,80	50,51	7,69		
EPOFc+ST6N	41,21	26,94	24,66	6,58	0,61
EPOFc+GNT-V+ST6N	21,30	44,53	26,87	6,64	0,66



**Figura 19: Perfiles de N-glicanos generados mediante cromatografía de intercambio débil (WAX) a partir de variantes de EPOFc expresadas en células epiteliales de glándula mamaria de cabras. A: EPOFc (control); B: EPOFc+ST6N; C: EPOFc+GNT-V+ST6N; D: Fetuina (Control). (Fuente: Elaboración propia).**

## **12. Ensayo de actividad hematopoyética en ratones.**

Para evaluar si las variantes obtenidas que presentan patrones de glicosilación distintos al control EPOFc, incrementan la actividad hematopoyética, realizamos ensayos de medición del hematocrito en sangre de ratones normocitémicos. Para esto, se inocularon 3 dosis de 88 ug/Kg de peso de cada animal en los días 0, 3 y 6 del experimento y se tomaron muestras cada 3 días en los primeros 12 días, y cada 6 días, hasta completar los 24 días del ensayo (Figura 20 A). Las muestras para el tratamiento fueron las siguientes: EPOFc, EPOFc+GNT-V+ST6N, EPOFc+ST6N, control positivo comercial Recormón y PBS como placebo. El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre EPOFc+GNT-V+ST6N y el placebo en todos los días del experimento. Tampoco se observaron diferencias significativas en los porcentajes de hematocrito entre EPOFc+ST6N y el placebo. (Figura 20 B). Si se observa una diferencia significativa en el día 6 para la variante EPOFc+ST6N en comparación al control positivo.



**Figura 20: Ensayo de actividad hematopoyética en ratones normocitémicos. A:** Diseño experimental que señala los días de tratamiento y de toma de muestras **B:** Medición del porcentaje del hematocrito. Valores corresponden al promedio  $\pm$  SEM de hematocrito,  $n=6$ , two way ANOVA, y el test post-análisis de Tukey de comparaciones múltiples. \*\*\*:  $p < 0,001$  (Fuente: Elaboración propia).

## DISCUSIÓN

Las células epiteliales de la glándula mamaria de animales, se presenta como un sistema de expresión de proteínas recombinantes de uso terapéutico que posee ventajas productivas en comparación a otros sistemas debido a la elevada capacidad secretora de la glándula y la fácil recolección diaria de la leche (Montesino and Toledo 2006). Diversos autores han utilizado este sistema para la expresión de proteínas recombinantes, entre ellos destacan trabajos en los que se logró expresar las proteínas humanas antitrombina, el inhibidor C1 y el factor de coagulación VII en la glándula mamaria de cabras y conejas transgénicos, respectivamente (Edmunds et al. 1998; van Veen et al. 2012; Chevreux et al. 2017). Las proteínas mencionadas anteriormente fueron aprobadas para su uso en humanos siendo el factor de coagulación VII la última en recibir esta aprobación bajo el nombre de SEVENFACT<sup>®</sup> en el año 2020.

Una alternativa al uso de animales transgénicos es la transducción *in situ* de la glándula mamaria utilizando vectores adenovirales. Hasta la fecha se han expresado distintas proteínas humanas utilizando esta metodología como son lactoferrina, antitrombina, glucocerebrosidasa y eritropoyetina (Zeng-Sheng et al. 2008; Yang et al. 2012; Tavares et al. 2016). Esta metodología permite expresar proteínas de uso terapéutico en un menor tiempo en comparación a la generación de animales transgénicos (Bertolini et al. 2016), sin embargo, las proteínas expresadas en la glándula mamaria presentan un patrón de N-glicosilación



característico que consiste mayoritariamente en estructuras de tipo di-antenaria y con presencia de 1 ácido siálico o ausencia de éste (Cremata et al. 2008). Lo anterior constituye una desventaja cuando se expresan bajo esta metodología, glicoproteínas de uso terapéutico que poseen una relación directa entre el patrón de glicosilación, la vida media de la molécula en circulación sanguínea y, por consiguiente, con sus funciones biológicas específicas.

Un ejemplo de lo anterior es la glicohormona eritropoyetina expresada en la glándula mamaria de cabras la que no muestra actividad biológica debido al patrón de glicosilación que presenta (Salgado et al. 2015). Las teorías propuestas para este fenómeno se relacionan con la alta capacidad secretora de la glándula en condiciones de lactancia lo que provoca una saturación de la ruta de secreción, principalmente en el aparato de Golgi. Este efecto provocaría que las glicoproteínas recombinantes, como la eritropoyetina, no alcancen su grado máximo de N-glicosilación (Toledo et al. 2005),

Diversos grupos de investigación han trabajado en modificar la ruta de glicosilación de distintos sistemas biológicos para poder expresar proteínas que posean un patrón de glicosilación característico y diferente al que posee el sistema en su forma nativa y que asegure su actividad biológica (Koffas et al. 2018; Caillava et al. 2019; Tripathi and Shrivastava 2019). Los trabajos anteriores se han realizado en sistemas como bacterias, levaduras, plantas y líneas celulares, sin embargo, no se ha reportado la modificación de la ruta de glicosilación en células epiteliales de la glándula mamaria de cabras.

Las estrategias para la modificación de los patrones de glicosilación se relacionan con el silenciamiento y la sobreexpresión de genes de enzimas claves en el proceso, y también de otros elementos como transportadores de monosacáridos (Ma et al. 2020; Agatemor et al. 2019)

Como objetivo general de nuestro trabajo, nos propusimos obtener una variante de eritropoyetina expresada en la glándula mamaria de cabra con un patrón de glicosilación de estructuras multi-antenadas y multi-sialiladas. Para esto, diseñamos una estrategia de expresión de esta glicohormona en conjunto con glicosiltransferasas que participan en el proceso de síntesis de oligosacáridos con un mayor grado de ramificación como GNT-IV y GNT-V. En este caso esperamos incrementar la ramificación de las antenas en los oligosacáridos unidos a EPOFc, además, realizamos la sobreexpresión de la glicosiltransferasa ST6N, que participa en la transferencia de ácido siálico terminal, monosacárido de gran importancia en el tiempo de vida media de glicoproteínas como eritropoyetina.

Inicialmente demostramos que es posible la sobreexpresión de EPOFc en conjunto con la glicosiltransferasa GNT-IV, mediante una co-transducción con dos vectores adenovirales diferentes en la línea celular de cérvix humana SiHa (Figura 1). Esta metodología ofrece ventajas como la expresión simultánea de dos o más proteínas de interés y es de gran importancia debido a su uso en terapia génica y tratamientos anticancerígenos (Shaw and Suzuki 2019; Ricobaraza et al. 2020;). En nuestro caso resultó ventajosa la utilización de estos

vectores al aplicarlos de manera directa, mediante la transducción *in situ*, en las células epiteliales mamarias de una hembra durante la lactación activa. Ya disponíamos de estos vectores en el laboratorio de forma independiente y su uso en co-transducción nos permitió demostrar, en primera instancia, que se puede lograr la modificación de la ruta de glicosilación mediante la sobre-expresión de glicosiltransferasas en las células mamarias *in vivo*.

La enzima GNT-IV cataliza la transferencia de GlcNAc en posición  $\beta$ -1,4 a una de las manosas del núcleo de N-glicanos lo que genera estructuras de tipo tri-antenarias. Demostramos que la expresión de EPOFc en conjunto con la enzima descrita, en la glándula mamaria de cabra, genera cambios en el patrón de glicosilación de EPOFc en comparación a la proteína sin modificar, aumentando la presencia de estructuras de mayor tamaño de tipo tri- o tetra-antenadas. Específicamente, se observa un incremento de estructuras complejas de tipo tri- y tetra-antenarias con y sin presencia de ácido siálico que no se identificaron en EPOFc sin modificar (Figuras 6 y 7, Tabla III). Estos resultados son consistentes con lo obtenido para expresión las enzimas GNT-IV y GNT-I, en conjunto con eritropoyetina humana, en células CHO. En este trabajo se obtuvo un incremento de estructuras de tipo tri-antenarias y, además, un aumento en estructuras terminadas en ácido siálico (Cha et al. 2017).

La presencia de ácido N-acetil-neuroamínico o ácido siálico en las estructuras de oligosacáridos, es relevante para evitar el reconocimiento de las glicoproteínas por los receptores de galactosa presentes en el hígado y su posterior eliminación

de la circulación sanguínea (Ghosh 2020). En nuestro trabajo, el incremento de las estructuras oligosacáridicas de mayor tamaño en EPOFc descrito anteriormente, no fue suficiente para aumentar la actividad biológica de la proteína en comparación al control negativo (Figura 8), lo que es esperable debido a la presencia reducida de estructuras terminadas en ácido siálico. Este resultado está en línea con lo demostrado anteriormente, donde se reportó una asociación directa entre el contenido de ácido siálico y la actividad biológica de esta proteína (Cowper et al. 2018).

Es por esto que con el fin de lograr una variante de EPOFc con actividad hematopoyética, nos propusimos sobre expresar la enzima ST6N, que cataliza la transferencia de ácido siálico a un residuo de galactosa terminal (Janesch et al. 2019). Además de ST6N, otra enzima clave en la generación de estructuras de oligosacáridos multi-antenas es GNT-V. Esta enzima cataliza la transferencia del monosacárido GlcNAc en posición  $\beta$ -1,6 a un residuo de manosa del núcleo de N-glicanos generando estructuras tri o tetra antenas por lo que la consideramos en esta nueva aproximación (Nagae et al. 2018).

Para realizar los ensayos de transformación genética *in situ* de las células epiteliales mamarias productoras de proteínas de leche, generamos tres vectores adenovirales que portan la información genética de EPOFc en conjunto con una de las enzimas mencionadas anteriormente (Figuras 9-13). La expresión de proteínas en las células epiteliales de la glándula mamaria de cabras mediada por vectores adenovirales se observó hasta el día 8 post-transducción (Figura

16). Lo anterior es consistente con lo reportado por Tavares et. al y Sánchez et al. quienes utilizaron esta metodología para expresar las proteínas glucocerebrosidasa y somatotropina, respectivamente, observando la presencia de estas moléculas hasta los días 6-8 post-transducción de la glándula mamaria (Sanchez et al. 2004; Zeng-Sheng et al. 2008; Tavares et al. 2016;). Estos resultados también concuerdan con otro trabajo, donde observaron que desde el día 4 post-transducción *in situ* del epitelio glandular mamario, se presenta un aumento significativo de los títulos de anticuerpos anti-adenovirus alcanzando un máximo el día 8 que se mantiene constante en los 21 días analizados. Este aumento en los títulos está directamente relacionado con los niveles de expresión de la proteína que disminuyen en los días siguientes debido a la presencia de anticuerpos anti adenovirus (Rodriguez et al. 2012).

Las variantes de EPOFc obtenidas se purificaron por cromatografía de afinidad en una matriz proteína A-sefarosa y analizamos los patrones de glicosilación mediante cromatografía de alta resolución en fase normal (NP-HPLC) en columna Amida-80. Esta metodología ofrece ventajas en comparación a otros métodos de análisis de glicanos como son: a) observar glicanos cargados y neutros al mismo tiempo; b) permite medir en forma precisa la cantidad relativa de cada tipo de glicano; c) puede separar estructuras basándose en su composición y tipos de unión (Campbell et al. 2008). Los perfiles obtenidos mostraron diferencias entre la variante EPOFc utilizada como control, en comparación a las variantes de esta glicoproteína que fueron expresadas en

conjunto con las otras glicosiltransferasas. En EPOFc se observó, que todas las estructuras aparecen a tiempos de retención entre los 16 y 28 min, mientras que en EPOFc+ST6N se presentan estructuras de mayor tamaño que eluyen desde el minuto 15 hasta el minuto 38 y que además presentan un aumento en el porcentaje de estructuras terminadas en ácido siálico en comparación al control. En esta variante, el porcentaje de estructuras de tipo neutro se mantiene, mientras que las estructuras con presencia de 1 ácido siálico disminuyen e incrementa el porcentaje de estructuras di-sialiladas (Figuras 18 y 19, Tablas IV y V). Esto concuerda con trabajos previos donde se realizaron distintos ensayos para obtener IgG con N-glicanos unidos que presentaran un menor grado de variabilidad. Uno de los ensayos realizados fue la sobreexpresión de la enzima ST6N con lo que lograron obtener un aumento de estructuras terminadas en ácido siálico (Dekkers et al. 2016).

El aumento de estructuras de mayor tamaño en EPOFc expresada en conjunto con GNT-V+ST6N también coincide con un aumento en las estructuras terminadas en ácido siálico (Figuras 18 y 19, Tablas IV y V). Esto era esperable debido a la acción de ambas enzimas en conjunto. Por una parte, GNT-V participa en la ramificación del núcleo de N-glicanos y ST6N genera estructuras con una mayor carga de ácido siálico. En esta variante, el porcentaje de estructuras neutras disminuye en un 20% en comparación al control y se observa un aumento en las estructuras de tipo di-, tri- y tetra-antena. Como se observó en la figura 19 B, el segmento correspondiente a estructuras mono-sialiladas se observa

posiblemente como una mezcla estructuras. Lo anterior es consistente con lo observado para EPO expresada en células CHO que presenta una mezcla de estructuras con 2, 3 y 4 ácidos siálicos presentes (Cowper et al. 2018). Sin embargo, es necesario complementar estos análisis para determinar la presencia de diversas estructuras en este segmento. Por otra parte, nuestros resultados también concuerdan con lo reportado por Yin et al. 2015, quienes generaron líneas estables de células CHO que expresaban en conjunto EPO y las enzimas  $\alpha$ -2,6 sialiltransferasa, GNT-IV y GNT-V, lo que condujo a una disminución de las estructuras mono-sialiladas y un aumento en estructuras tri- y tetra-sialiladas (Yin et al. 2015)

Un resultado relevante para nuestro estudio fue que la combinación EPOFc+ST6N presenta una menor diversidad de estructuras en comparación a la variante que se expresa en conjunto con GNT-V. Lo anterior puede estar dado por la metodología utilizada ya que el tejido glandular mamario fue transducido con 2 vectores adenovirales por separado, es decir, el primer vector que lleva EPOFc+GNT-V y el segundo vector EPOFc+ST6N. Es probable que no todas las células hayan incorporado ambos vectores, lo que genera variantes provenientes de células que tienen sólo uno o el otro vector, o ambos respectivamente.

La actividad hematopoyética de EPO depende directamente de su patrón de glicosilación (Caval et al. 2018). En nuestros resultados, ninguna de las variantes de EPOFc generadas presentó diferencias significativas en el incremento del porcentaje de hematocrito en comparación al control. Lo anterior puede estar

explicado por el porcentaje de estructuras de tipo neutras que representan, en el caso de EPOFc+ST6N un 41% y en EPOFc+GNT-V+ST6N un 21%. Esto estaría afectando directamente el tiempo de vida media de las variantes obtenidas, que si bien presentan estructuras de mayor grado de ramificación esto no es suficiente para aumentar el tiempo de vida media. Además, se observa un porcentaje menor al 10% de estructuras de tipo tri y tetra-sialiladas lo que tendría un impacto directo en la actividad de esta glicohormona.

## CONCLUSIÓN

La modificación genética de la ruta de glicosilación de las células epiteliales de la glándula mamaria de cabras *in vivo* con las enzimas GNT-IV, GNT-V y ST6N, garantiza la expresión de una variante de eritropoyetina humana recombinante con estructuras de N-glicanos de tipo complejo, de mayor tamaño y mayor grado de ramificación en comparación a su variante sin modificar. Este resultado demuestra que la composición de oligosacáridos N-enlazados a glicoproteínas expresadas en la glándula mamaria de cabras se asocia directamente a la biodisponibilidad de glicosiltransferasas específicas del aparato de Golgi durante la lactancia activa.



## REFERENCIAS

Aebi, M. 2013. 'N-linked protein glycosylation in the ER', *Biochim Biophys Acta*, 1833: 2430-7.

Agatemor, C., M. J. Buettner, R. Ariss, K. Muthiah, C. T. Saeui, and K. J. Yarema. 2019. 'Exploiting metabolic glycoengineering to advance healthcare', *Nat Rev Chem*, 3: 605-20.

Ahmad, M., M. Hirz, H. Pichler, and H. Schwab. 2014. 'Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production', *Appl Microbiol Biotechnol*, 98: 5301-17.

An, H. J., J. W. Froehlich, and C. B. Lebrilla. 2009. 'Determination of glycosylation sites and site-specific heterogeneity in glycoproteins', *Curr Opin Chem Biol*, 13: 421-6.

Baghban, R., S. Farajnia, M. Rajabibazl, Y. Ghasemi, A. Mafi, R. Hoseinpoor, L. Rahbarnia, and M. Aria. 2019. 'Yeast Expression Systems: Overview and Recent Advances', *Mol Biotechnol*, 61: 365-84.

Barnes, L. M., C. Bentley, and A. J. Dickson. 2000. 'Advances in animal cell recombinant protein production: GS-NS0 expression system', *Cytotechnology*, 32: 109-23.

Barolo, L., R. M. Abbriano, A. S. Commault, J. George, T. Kahlke, M. Fabris, M. P. Padula, A. Lopez, P. J. Ralph, and M. Pernice. 2020. 'Perspectives for Glyco-Engineering of Recombinant Biopharmaceuticals from Microalgae', *Cells*, 9.

Bertolini, L. R., H. Meade, C. R. Lazzarotto, L. T. Martins, K. C. Tavares, M. Bertolini, and J. D. Murray. 2016. 'The transgenic animal platform for biopharmaceutical production', *Transgenic Res*, 25: 329-43.

Bon, C., T. Hofer, A. Bousquet-Melou, M. R. Davies, and B. F. Krippendorff. 2017. 'Capacity limits of asialoglycoprotein receptor-mediated liver targeting', *MAbs*, 9: 1360-69.

Bosze, Z. ; Baranyi, M.; Bruce, C.; Whitelaw, A. 2008. 'Producing-recombinant-human-milk-proteins-in-the-milk-of-livestock', *Bioactive Components of Milk*: 357-93.

Breitling, J., and M. Aebi. 2013. 'N-linked protein glycosylation in the endoplasmic reticulum', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5: a013359.

- Buettner, M. J., S. R. Shah, C. T. Saeui, R. Ariss, and K. J. Yarema. 2018. 'Improving Immunotherapy Through Glycodesign', *Front Immunol*, 9: 2485.
- Butler, M., and M. Spearman. 2014. 'The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering', *Curr Opin Biotechnol*, 30: 107-12.
- Bunn, H. F. 2013. 'Erythropoietin', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3: a011619.
- Caillava, A. J., G. E. Ortiz, L. J. Melli, J. E. Ugalde, A. E. Ciocchini, and D. J. Comerci. 2019. 'Improving bioreactor production of a recombinant glycoprotein in Escherichia coli: Effect of specific growth rate on protein glycosylation and specific productivity', *Biotechnol Bioeng*, 116: 1427-38.
- Campbell, M. P., L. Royle, C. M. Radcliffe, R. A. Dwek, and P. M. Rudd. 2008. 'GlycoBase and autoGU: tools for HPLC-based glycan analysis', *Bioinformatics*, 24: 1214-6.
- Caval, T., W. Tian, Z. Yang, H. Clausen, and A. J. R. Heck. 2018. 'Direct quality control of glycoengineered erythropoietin variants', *Nat Commun*, 9: 3342.
- Cha, H. M., J. H. Lim, J. H. Yeon, J. M. Hwang, and D. I. Kim. 2017. 'Co-overexpression of Mgat1 and Mgat4 in CHO cells for production of highly sialylated albumin-erythropoietin', *Enzyme Microb Technol*, 103: 53-58.
- Chen, R. 2012. 'Bacterial expression systems for recombinant protein production: E. coli and beyond', *Biotechnol Adv*, 30: 1102-7.
- Chevreux, G., N. Tilly, Y. Leblanc, C. Ramon, V. Faid, M. Martin, F. Dhainaut, and N. Bihoreau. 2017. 'Biochemical characterization of LR769, a new recombinant factor VIIa bypassing agent produced in the milk of transgenic rabbits', *Haemophilia*, 23: e324-e34.
- Chin, C. L., J. B. Goh, H. Srinivasan, K. I. Liu, A. Gowher, R. Shanmugam, H. L. Lim, M. Choo, W. Q. Tang, A. H. Tan, T. Nguyen-Khuong, M. H. Tan, and S. K. Ng. 2019. 'A human expression system based on HEK293 for the stable production of recombinant erythropoietin', *Sci Rep*, 9: 16768.
- Christine M. Szymanski, Ruijin Yao, Cheryl P. Ewing, Trevor J. Trust and Patricia Guerry. 1999. 'Evidence for a system of general protein glycosylation in Campylobacter jejuni', *Molecular Microbiology*, 32 1022-30.
- Clark, J. 1998. 'The Mammary Gland as a Bioreactor- Expression, Processing, and Production of Recombinant Proteins', *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 337-350.

Cole, Laurence, and Peter R. Kramer. 2016. 'Macronutrients.', *Human Physiology, Biochemistry and Basic Medicine*.

Cowie, A. T., I. A. Forsyth, and I. C. Hart. 1980. 'Hormonal control of lactation', *Monogr Endocrinol*, 15: I-xiv, 1-275.

Cowper, B., X. Li, L. Yu, Y. Zhou, W. H. Fan, and C. M. Rao. 2018. 'Comprehensive glycan analysis of twelve recombinant human erythropoietin preparations from manufacturers in China and Japan', *J Pharm Biomed Anal*, 153: 214-20.

Cremata, J., R. Montesino Segui, J. R. Toledo, O. Sánchez, and M. P. Rodriguez. 2008. 'Knowing the glycosylation machinery of mammary gland cells', *Biotechnología Aplicada*, 373-377.

Cummings, R. D. 2005. 'Glycosylation', *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Bioinformatics*.

D'Addio, M., J. Frey, and V. I. Otto. 2020. 'The manifold roles of sialic acid for the biological functions of endothelial glycoproteins', *Glycobiology*, 30: 490-99.

Dekkers, G., R. Plomp, C. A. Koeleman, R. Visser, H. H. von Horsten, V. Sandig, T. Rispen, M. Wuhler, and G. Vidarsson. 2016. 'Multi-level glyco-engineering techniques to generate IgG with defined Fc-glycans', *Sci Rep*, 6: 36964.

Demain, A. L., and P. Vaishnav. 2009. 'Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms', *Biotechnol Adv*, 27: 297-306.

Devinoy, E. 1994. 'High level production of human growth hormone in the milk of transgenic mice: the upstream region of the rabbit whey acidic protein (WAP) gene targets transgene expression to the mammary gland', *Transgenic Res*, 3: 79-89.

Dyck, Michael K. 1999. 'Seminal vesicle production and secretion of growth hormone into seminal fluid', *NATURE BIOTECHNOLOGY* 17: 1087-90.

Edmunds, T., S. Van Patten, J. Pollock, E. Hanson, R. Bernasconi, E. Higgins, P. Manavalan, C. Ziomek, H. Meade, J. McPherson, and E. S. Cole. 1998. 'Transgenically Produced Human Antithrombin: Structural and Functional Comparison to Human Plasma-Derived Antithrombin', *Blood*, 91: 4561-71.

- El Mai, N., S. Donadio-Andrei, C. Iss, V. Calabro, and C. Ronin. 2013. 'Engineering a human-like glycosylation to produce therapeutic glycoproteins based on 6-linked sialylation in CHO cells', *Methods Mol Biol*, 988: 19-29.
- Engelking, Larry R. 2015. 'Carbohydrate Structure', *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry*.
- Ferreira, I. G., M. Pucci, G. Venturi, N. Malagolini, M. Chiricolo, and F. Dall'Olio. 2018. 'Glycosylation as a Main Regulator of Growth and Death Factor Receptors Signaling', *Int J Mol Sci*, 19.
- Fischer, S., R. Handrick, and K. Otte. 2015. 'The art of CHO cell engineering: A comprehensive retrospect and future perspectives', *Biotechnol Adv*, 33: 1878-96.
- Fisher, P., and D. Ungar. 2016. 'Bridging the Gap between Glycosylation and Vesicle Traffic', *Front Cell Dev Biol*, 4: 15.
- Fukuta, K., R. Abe, T. Yokomatsu, N. Kono, M. Asanagi, F. Omae, M. T. Minowa, M. Takeuchi, and T. Makino. 2000. 'Remodeling of sugar chain structures of human interferón gamma', *Glycobiology*, 4: 421-30.
- Fukuta, K., R. Abe, T. Yokomatsu, M. T. Minowa, M. Takeuchi, M. Asanagi, and T. Makino. 2001. 'The widespread effect of beta 1,4-galactosyltransferase on N-glycan processing', *Arch Biochem Biophys*, 392: 79-86.
- Ghazarian, H., B. Idoni, and S. B. Oppenheimer. 2011. 'A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics', *Acta Histochem*, 113: 236-47.
- Ghezlou, M., F. Mokhtari, A. Kalbasi, G. Riazi, H. Kaghazian, R. Emadi, and A. R. Aref. 2020. 'Aggregate Forms of Recombinant Human Erythropoietin With Different Charge Profile Substantially Impact Biological Activities', *J Pharm Sci*, 109: 277-83.
- Ghosh, Shyamasree. 2020. 'Sialic acid and biology of life: An introduction.' in, *Sialic Acids and Sialoglycoconjugates in the Biology of Life, Health and Disease*.
- Goh, J. B., and S. K. Ng. 2018. 'Impact of host cell line choice on glycan profile', *Crit Rev Biotechnol*, 38: 851-67.
- Goh, J. S., Y. Liu, K. F. Chan, C. Wan, G. Teo, P. Zhang, Y. Zhang, and Z. Song. 2014. 'Producing recombinant therapeutic glycoproteins with enhanced sialylation using CHO-gmt4 glycosylation mutant cells', *Bioengineered*, 5: 269-73.

Goncalves, A. M. 2013. 'Pichia pastoris: A Recombinant Microfactory for Antibodies and Human Membrane Proteins', *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23: 587-601.

Gordon, K. 1987. 'Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mouse milk', *Nature*, 5: 1183-87.

Graham, F. L., and L. Prevec. 1995. 'METHODS FOR CONSTRUCTION OF ADENOVIRUS VECTORS', *Molecular Biotechnology*, 3: 207-20.

Hamilton, S. R., P. Bobrowicz, B. Bobrowicz, R. C. Davidson, H. Li, T. Mitchell, J. H. Nett, S. Rausch, T. A. Stadheim, H. Wischnewski, S. Wildt, and T. U. Gerngross. 2003. 'Production of complex human glycoproteins in yeast', *Science*, 301: 1244-6.

Hamilton, S. R., R. C. Davidson, N. Sethuraman, J. H. Nett, Y. Jiang, S. Rios, P. Bobrowicz, T. A. Stadheim, H. Li, B. K. Choi, D. Hopkins, H. Wischnewski, J. Roser, T. Mitchell, R. R. Strawbridge, J. Hoopes, S. Wildt, and T. U. Gerngross. 2006. 'Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins', *Science*, 313: 1441-3.

Harduin-Lepers, Anne; Veronica Vallejo-Ruiz, Marie-Ange Krzewinski-Recchi, Bénédicte Samyn-Petit, Sylvain Julien, Philippe Delannoy. 2001. 'The human sialyltransferase family', *Biochimie*, 83: 727-37.

Heffner, K. M., Q. Wang, D. B. Hizal, O. Can, and M. J. Betenbaugh. 2018. 'Glycoengineering of Mammalian Expression Systems on a Cellular Level', *Adv Biochem Eng Biotechnol*.

Hossler, P., S. F. Khattak, and Z. J. Li. 2009. 'Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture', *Glycobiology*, 19: 936-49.

Houdebine, L. M. 2000. 'Transgenic animal bioreactors', *Transgenic Research*, 9 : 305–20.

Hunter, P. 2019. 'The prospects for recombinant proteins from transgenic animals: A few successes along with the advent of new technologies increase the allure of transgenic animals for the production of therapeutic human proteins', *EMBO Rep*, 20: e48757.

Ihara, Hideyuki; Ikeda, Yoshitaka; Koyota, Souichi; Endo, Takeshi; Honke, Koichi and Taniguchi, Naoyuki. 2002. 'A catalytically inactive b1,4-N-acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III) behaves as a dominant negative GnT-III inhibitor', *Eur J Biochem*, 269: 193-201.

Janesch, B., H. Saxena, L. Sim, and W. W. Wakarchuk. 2019. 'Comparison of alpha2,6-sialyltransferases for sialylation of therapeutic proteins', *Glycobiology*, 29: 735-47.

Jayaprakash, N. G., and A. Surolia. 2017. 'Role of glycosylation in nucleating protein folding and stability', *Biochem J*, 474: 2333-47.

Jelkmann, W. 2007. 'Erythropoietin after a century of research: younger than ever', *Eur J Haematol*, 78: 183-205.

Jeong, Y. T., O. Choi, Y. D. Son, S. Y. Park, and J. H. Kim. 2009. 'Enhanced sialylation of recombinant erythropoietin in genetically engineered Chinese-hamster ovary cells', *Biotechnol Appl Biochem*, 52: 283-91.

Jiang, H., A. A. Horwitz, C. Wright, A. Tai, E. A. Znameroski, Y. Tsegaye, H. Warbington, B. S. Bower, C. Alves, C. Co, K. Jonnalagadda, D. Platt, J. M. Walter, V. Natarajan, J. A. Ubersax, J. R. Cherry, and J. C. Love. 2019. 'Challenging the workhorse: Comparative analysis of eukaryotic micro-organisms for expressing monoclonal antibodies', *Biotechnol Bioeng*, 116: 1449-62.

Jigami, Y. 2008. 'Yeast glycobiology and its application', *Biosci Biotechnol Biochem*, 72: 637-48.

Joseph, Bilgimol C., Suthakaran Pichaimuthu, and Sankaranarayanan Srimeenakshi. 2015. 'An Overview of the Parameters for Recombinant Protein Expression in Escherichia coli', *Journal of Cell Science & Therapy*, 06.

Kalantar-Zadeh, K. 2017. 'History of Erythropoiesis-Stimulating Agents, the Development of Biosimilars, and the Future of Anemia Treatment in Nephrology', *Am J Nephrol*, 45: 235-47.

Kerr, David E. 1998. 'The bladder as a bioreactor: Urothelium production and secretion of growth hormone into urine', *Nat Biotechnol*, 16: 75-79.

Khan, K.H. 2009. 'Gene transfer technologies leading to transgenic animals', *Journal of Ecobiotechnology*, 1: 32:40.

Koffas, Mattheos A. G., Robert J. Linhardt, Qiong Wang, and Michael J. Betenbaugh. 2018. 'Metabolic engineering of CHO cells to prepare glycoproteins', *Emerging Topics in Life Sciences*, 2: 433-42.

- Koles, K., P. H. van Berkel, F. R. Pieper, J. H. Nuijens, M. L. Mannesse, J. F. Vliegthart, and J. P. Kamerling. 2004. 'N- and O-glycans of recombinant human C1 inhibitor expressed in the milk of transgenic rabbits', *Glycobiology*, 14: 51-64.
- Krasnova, L., and C. H. Wong. 2016. 'Understanding the Chemistry and Biology of Glycosylation with Glycan Synthesis', *Annu Rev Biochem*, 85: 599-630.
- Laemmli, U. K. 1970. 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4', *Nature*, 227: 680-5.
- Lakowitz, A., T. Godard, R. Biedendieck, and R. Krull. 2018. 'Mini review: Recombinant production of tailored bio-pharmaceuticals in different Bacillus strains and future perspectives', *Eur J Pharm Biopharm*, 126: 27-39.
- Lalonde, M. E., and Y. Durocher. 2017. 'Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells', *J Biotechnol*, 251: 128-40.
- Langlais, Claudia, and Bernhard Korn. 2006. 'Recombinant Protein Expression in Bacteria.' in, *Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine* (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg).
- Lappin, T. R., and F. S. Lee. 2019. 'Update on mutations in the HIF: EPO pathway and their role in erythrocytosis', *Blood Rev*, 37: 100590.
- Lerias, J. R., L. E. Hernandez-Castellano, A. Suarez-Trujillo, N. Castro, A. Poulis, and A. M. Almeida. 2014. 'The mammary gland in small ruminants: major morphological and functional events underlying milk production--a review', *J Dairy Res*, 81: 304-18.
- Liao, C., and Q. Zhang. 2020. 'Understanding the Oxygen-Sensing Pathway and Its Therapeutic Implications in Diseases', *Am J Pathol*, 190: 1584-95.
- Liu, L., W. Zhang, Y. Song, W. Wang, Y. Zhang, T. Wang, K. Li, Q. Pan, X. Qi, Y. Gao, L. Gao, C. Liu, Y. Zhang, Y. Wang, G. He, X. Wang, and H. Cui. 2018. 'Recombinant Lactococcus lactis co-expressing OmpH of an M cell-targeting ligand and IBDV-VP2 protein provide immunological protection in chickens', *Vaccine*, 36: 729-35.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. 'Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method', *Methods*, 25: 402-8.
- Lombard, J. 2016. 'The multiple evolutionary origins of the eukaryotic N-glycosylation pathway', *Biol Direct*, 11: 36.

Ma, B., X. Guan, Y. Li, S. Shang, J. Li, and Z. Tan. 2020. 'Protein Glycoengineering: An Approach for Improving Protein Properties', *Front Chem*, 8: 622.

Massoud, M.; Attal, J.; Thépot, D.; Pontu, H.; Stinnakre, M.G.; Théron, M.C.; Lopez, C.; Houdebine, L.M. 1996. 'The deleterious effects of human erythropoietin gene driven by the rabbit whey acidic protein gene promoter in transgenic rabbits', *Reprod. Nutr. Dev*, 36: 555-63.

McDonald, A. G., J. M. Hayes, T. Bezak, S. A. Gluchowska, E. F. Cosgrave, W. B. Struwe, C. J. Stroop, H. Kok, T. van de Laar, P. M. Rudd, K. F. Tipton, and G. P. Davey. 2014. 'Galactosyltransferase 4 is a major control point for glycan branching in N-linked glycosylation', *J Cell Sci*, 127: 5014-26.

Mizukami, A., A. L. Caron, V. Picanco-Castro, and K. Swiech. 2018. 'Platforms for Recombinant Therapeutic Glycoprotein Production', *Methods Mol Biol*, 1674: 1-14.

Montesino, R., and J. R. Toledo. 2006. 'La glándula mamaria biofábrica para la producción de proteínas recombinantes', *Biotecnología Aplicada*, 23: 271-78.

Montesino, R., J. R. Toledo, O. Sanchez, A. Sanchez, D. J. Harvey, L. Royle, R. A. Dwek, P. M. Rudd, G. J. Gerwig, J. P. Kamerling, and J. A. Cremata. 2008. 'Monosialylated biantennary N-glycoforms containing GalNAc-GlcNAc antennae predominate when human EPO is expressed in goat milk', *Arch Biochem Biophys*, 470: 163-75.

Murakami, M., T. Kiuchi, M. Nishihara, K. Tezuka, R. Okamoto, M. Izumi, and Y. Kajihara. 2016. 'Chemical synthesis of erythropoietin glycoforms for insights into the relationship between glycosylation pattern and bioactivity', *Science advances*, 2.

Mustopa, A. Z., S. Mariyah, Fatimah, S. Budiarti, H. Murtiyaningsih, and W. N. Alfisyahrin. 2018. 'Construction, heterologous expression, partial purification, and in vitro cytotoxicity of the recombinant plantaricin E produced by *Lactococcus lactis* against Enteropathogenic *Escherichia coli* K.1.1 and human cervical carcinoma (HeLa) cells', *Mol Biol Rep*, 45: 1235-44.

Nagae, M., Y. Kizuka, E. Mihara, Y. Kitago, S. Hanashima, Y. Ito, J. Takagi, N. Taniguchi, and Y. Yamaguchi. 2018. 'Structure and mechanism of cancer-associated N-acetylglucosaminyltransferase-V', *Nat Commun*, 9: 3380.

Nagashima, Y., A. von Schaewen, and H. Koiwa. 2018. 'Function of N-glycosylation in plants', *Plant Sci*, 274: 70-79.



Nielsen, J. 2013. 'Production of biopharmaceutical proteins by yeast: advances through metabolic engineering', *Bioengineered*, 4: 207-11.

Nothaft, H., and C. M. Szymanski. 2010. 'Protein glycosylation in bacteria: sweeter than ever', *Nat Rev Microbiol*, 8: 765-78.

Owczarek, B., A. Gerszberg, and K. Hnatuszko-Konka. 2019. 'A Brief Reminder of Systems of Production and Chromatography-Based Recovery of Recombinant Protein Biopharmaceuticals', *Biomed Res Int*, 2019: 4216060.

Pandhal, J., and P. C. Wright. 2010. 'N-Linked glycoengineering for human therapeutic proteins in bacteria', *Biotechnol Lett*, 32: 1189-98.

Park, S. S., W. W. Wu, Y. Zhou, R. F. Shen, B. Martin, and S. Maudsley. 2012. 'Effective correction of experimental errors in quantitative proteomics using stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC)', *J Proteomics*, 75: 3720-32.

Peng, B., G. Kong, C. Yang, and Y. Ming. 2020. 'Erythropoietin and its derivatives: from tissue protection to immune regulation', *Cell Death Dis*, 11: 79.

Peter Li, Colin J. Wilde, Lynn M.B. Finch, David G. Fernig & Philip S. Rudland;. 1999. 'Identification of cell types in the developing goat mammary gland', *The Histochemical Journal*, 31: 379-93.

'polysaccharides.' in. 2009. *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*.

Quianzon, C. C., and I. Cheikh. 2012. 'History of insulin', *J Community Hosp Intern Med Perspect*, 2.

Ramakrishnan, R., W. K. Cheung, M. C. Wacholtz, N. Minton, and W. J. Jusko. 2004. 'Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of recombinant human erythropoietin after single and multiple doses in healthy volunteers', *J Clin Pharmacol*, 44: 991-1002.

Ramos Moura, R. . 2011. 'Production of Recombinant Proteins in Milk of Transgenic and Non-transgenic Goats', *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 54: 927-38.

Raymond, Céline, Anna Robotham, Maureen Spearman, Michael Butler, John Kelly, and Yves Durocher. 2015. 'Production of IgGs with a human-like sialylation in CHO cells', *BMC Proceedings*, 9.

Reily, C., T. J. Stewart, M. B. Renfrow, and J. Novak. 2019. 'Glycosylation in health and disease', *Nat Rev Nephrol*, 15: 346-66.

Ricobaraza, A., M. Gonzalez-Aparicio, L. Mora-Jimenez, S. Lumbreras, and R. Hernandez-Alcoceba. 2020. 'High-Capacity Adenoviral Vectors: Expanding the Scope of Gene Therapy', *Int J Mol Sci*, 21.

Rodriguez, E. S., A. G. Pose, M. P. Molto, A. S. Espinoza, P. A. Zamora, and M. S. Pedroso. 2012. 'Biosafety evaluation of recombinant protein production in goat mammary gland using adenoviral vectors: preliminary study', *Biotechnol J*, 7: 1049-53.

Saeed, H., H. Soudan, A. El-Sharkawy, A. Farag, A. Embaby, and F. Ataya. 2018. 'Expression and Functional Characterization of Pseudomonas aeruginosa Recombinant L.Asparaginase', *Protein J*, 37: 461-71.

Salgado, E. R., R. Montesino, S. P. Jimenez, M. Gonzalez, F. Hugues, O. I. Cabezas, R. Maura-Perez, P. Saavedra, E. Lamazares, A. Salas-Burgos, J. C. Vera, O. Sanchez, and J. R. Toledo. 2015. 'Post-translational modification of a chimeric EPO-Fc hormone is more important than its molecular size in defining its in vivo hematopoietic activity', *Biochim Biophys Acta*, 1850: 1685-93.

Sanchez, O., J. R. Toledo, M. P. Rodriguez, and F. O. Castro. 2004. 'Adenoviral vector mediates high expression levels of human growth hormone in the milk of mice and goats', *J Biotechnol*, 114: 89-97.

Schmid, H. 2014. 'Cost-effectiveness of continuous erythropoietin receptor activator in anemia', *Clinicoecon Outcomes Res*, 6: 319-30.

Schwarz, F., W. Huang, C. Li, B. L. Schulz, C. Lizak, A. Palumbo, S. Numao, D. Neri, M. Aebi, and L. X. Wang. 2010. 'A combined method for producing homogeneous glycoproteins with eukaryotic N-glycosylation', *Nat Chem Biol*, 6: 264-6.

Seitz, Oliver. 2000. 'Glycopeptide synthesis and the effects of glycosylation on protein structure and activity', *CHEMBIOCHEM*, 1: 214-46.

Selvaggi, M., V. Laudadio, C. Dario, and V. Tufarelli. 2014. 'Major proteins in goat milk: an updated overview on genetic variability', *Mol Biol Rep*, 41: 1035-48.

Shaw, A. R., and M. Suzuki. 2019. 'Immunology of Adenoviral Vectors in Cancer Therapy', *Mol Ther Methods Clin Dev*, 15: 418-29.

Shi, X., J. Yang, H. Zhu, L. Ye, M. Feng, J. Li, H. Huang, Q. Tao, D. Ye, L. H. Sun, B. N. Sun, C. R. Sun, G. Han, Y. Liu, M. Yao, P. Zhou, and D. Ju. 2013. 'Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human EPO-Fc fusion protein in vivo', *PLoS One*, 8: e72673.

Simons, J.P.; McClenaghan, M.; Clark, J. 1987. 'Alteration of the quality of milk by expression of sheep beta-lactoglobulin in transgenic mice', *Nature*, 328: 530-32.

Skibeli, V., G. Nissen-Lie, and P. Torjesen. 2001. 'Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin', *Blood*, 98: 3626-34.

Son, Y. D., Y. T. Jeong, S. Y. Park, and J. H. Kim. 2011. 'Enhanced sialylation of recombinant human erythropoietin in Chinese hamster ovary cells by combinatorial engineering of selected genes', *Glycobiology*, 21: 1019-28.

Spiro, Robert G. 2002. 'Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds', *Glycobiology*, 12: 43R-56R.

Srichaisupakit, A., T. Ohashi, R. Misaki, and K. Fujiyama. 2015. 'Production of initial-stage eukaryotic N-glycan and its protein glycosylation in *Escherichia coli*', *J Biosci Bioeng*, 119: 399-405.

Stanley, P., N. Taniguchi, and M. Aebi. 2017. 'N-glycans.' in, *Essentials of Glycobiology 3rd edition* (Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Stockert, R. 1995. 'The Asialoglycoprotein Receptor- Relationships Between Structure, Function, and Expression', *the American Physiological Society*, 75: 591-609.

Strasser, R. 2016. 'Plant protein glycosylation', *Glycobiology*, 26: 926-39.

Stylianopoulos, C. 2013. 'Carbohydrates: Chemistry and Classification.' in, *Encyclopedia of Human Nutrition*.

Takeuchi, M., N. Inoue, T. W. Strickland, M. Kubota, M. Wada, R. Shimizu, S. Hoshi, H. Kozutsumi, S. Takasaki, and A. Kobata. 1989. 'Relationship between sugar chain structure and biological activity of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86: 7819-22.

Tavares, K. C., A. C. Dias, C. R. Lazzarotto, S. Gaudencio Neto, I. de Sa Carneiro, F. L. Ongaratto, A. F. Pinto, L. H. de Aguiar, C. E. Calderon, J. R. Toledo, F. O. Castro, D. S. Santos, J. M. Chies, M. Bertolini, and L. R. Bertolini. 2016. 'Transient

Expression of Functional Glucocerebrosidase for Treatment of Gaucher's Disease in the Goat Mammary Gland', *Mol Biotechnol*, 58: 47-55.

Taylor, M. E., and K. Drickamer. 2019. 'Mammalian sugar-binding receptors: known functions and unexplored roles', *FEBS J*, 286: 1800-14.

Toledo, J. R., O. Sanchez, R. Montesino Segui, Y. Fernandez Garcia, J. Cremata, and M. P. Rodriguez. 2005. 'New procedure for production of biopharmaceutical', *Biotecnología Aplicada*, 22: 62-67.

Toledo, J. R., O. Sanchez, R. Montesino Segui, Y. Fernandez Garcia, M. P. Rodriguez, and J. A. Cremata. 2005. 'Differential in vitro and in vivo glycosylation of human erythropoietin expressed in adenovirally transduced mouse mammary epithelial cells', *Biochim Biophys Acta*, 1726: 48-56.

Toledo, J. R., O. Sanchez, R. M. Segui, G. Garcia, M. Montanez, P. A. Zamora, M. P. Rodriguez, and J. A. Cremata. 2006. 'High expression level of recombinant human erythropoietin in the milk of non-transgenic goats', *J Biotechnol*, 123: 225-35.

Tripathi, N. K., and A. Shrivastava. 2019. 'Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development', *Front Bioeng Biotechnol*, 7: 420.

Uversky, V. N., and E. M. Redwan. 2016. 'Erythropoietin and co.: intrinsic structure and functional disorder', *Mol Biosyst*, 13: 56-72.

Vocanec, D., T. Prijatelj, N. Debeljak, and T. Kunej. 2019. 'Genetic variants of erythropoietin (EPO) and EPO receptor genes in familial erythrocytosis', *Int J Lab Hematol*, 41: 162-67.

Valderrama-Rincon, J. D., A. C. Fisher, J. H. Merritt, Y. Y. Fan, C. A. Reading, K. Chhiba, C. Heiss, P. Azadi, M. Aebi, and M. P. DeLisa. 2012. 'An engineered eukaryotic protein glycosylation pathway in *Escherichia coli*', *Nat Chem Biol*, 8: 434-6.

Van den Steen, P., P. M. Rudd, R. A. Dwek, and G. Opdenakker. 1998. 'Concepts and principles of O-linked glycosylation', *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 33: 151-208.  
van Veen, H. A., J. Koiter, C. J. Voegelzang, N. van Wessel, T. van Dam, I. Velterop, K. van Houdt, L. Kupers, D. Horbach, M. Salaheddine, J. H. Nuijens, and M. L. Mannesse. 2012. 'Characterization of recombinant human C1 inhibitor secreted in milk of transgenic rabbits', *J Biotechnol*, 162: 319-26.

Varki, A., R. D. Cummings, M. Aebi, N. H. Packer, P. H. Seeberger, J. D. Esko, P. Stanley, G. Hart, A. Darvill, T. Kinoshita, J. J. Prestegard, R. L. Schnaar, H. H.

Freeze, J. D. Marth, C. R. Bertozzi, M. E. Etzler, M. Frank, J. F. Vliegthart, T. Lutteke, S. Perez, E. Bolton, P. Rudd, J. Paulson, M. Kanehisa, P. Toukach, K. F. Aoki-Kinoshita, A. Dell, H. Narimatsu, W. York, N. Taniguchi, and S. Kornfeld. 2015. 'Symbol Nomenclature for Graphical Representations of Glycans', *Glycobiology*, 25: 1323-4.

Wacker, M., D. Linton, P. Hitchen, M. Nita-Lazar, S. Haslam, S. North, M. Panico, H. Morris, A. Dell, B. W. Wren, and M. Aebi. 2002. 'N-Linked Glycosylation in *Campylobacter jejuni* and Its functional transfer into *E. coli*', *Science*, 298: 1790-93.

Walsh, G. 2018. 'Biopharmaceutical benchmarks 2018', *Nat Biotechnol*, 36: 1136-45.

Wang, L., L. Di, and C. T. Noguchi. 2014. 'Erythropoietin, a novel versatile player regulating energy metabolism beyond the erythroid system', *Int J Biol Sci*, 10: 921-39.

Wang, P., H. Wang, J. Gai, X. Tian, X. Zhang, Y. Lv, and Y. Jian. 2017. 'Evolution of protein N-glycosylation process in Golgi apparatus which shapes diversity of protein N-glycan structures in plants, animals and fungi', *Sci Rep*, 7: 40301.

Wang, Q., B. Yin, C. Y. Chung, and M. J. Betenbaugh. 2017. 'Glycoengineering of CHO Cells to Improve Product Quality', *Methods Mol Biol*, 1603: 25-44.

Wang, Y., S. Zhao, L. Bai, J. Fan, and E. Liu. 2013. 'Expression systems and species used for transgenic animal bioreactors', *Biomed Res Int*, 2013: 580463.  
Wells, L., and T. Feizi. 2019. 'Editorial overview: Carbohydrates: O-glycosylation', *Curr Opin Struct Biol*, 56: iii-v.

Woodland, A. L., S. W. Murphy, B. M. Curtis, and B. J. Barrett. 2017. 'Costs Associated With Intravenous Darbepoetin Versus Epoetin Therapy in Hemodialysis Patients: A Randomized Controlled Trial', *Can J Kidney Health Dis*, 4: 2054358117716461.

Yang, H., Q. Li, Z. Han, and J. Hu. 2012. 'High level expression of recombinant human antithrombin in the mammary gland of rabbits by adenoviral vectors infection', *Anim Biotechnol*, 23: 89-100.

Yang, S., P. Onigman, W. W. Wu, J. Sjogren, H. Nyhlen, R. F. Shen, and J. Cipollo. 2018. 'Deciphering Protein O-Glycosylation: Solid-Phase Chemoenzymatic Cleavage and Enrichment', *Anal Chem*, 90: 8261-69.

Yasuoka, Y., T. Fukuyama, Y. Izumi, Y. Nakayama, H. Inoue, K. Yanagita, T. Oshima, T. Yamazaki, T. Uematsu, N. Kobayashi, Y. Shimada, Y. Nagaba, M. Mukoyama, T. Yamashita, Y. Sato, J. M. Sands, K. Kawahara, and H. Nonoguchi. 2020. 'Erythropoietin production by the kidney and the liver in response to severe hypoxia evaluated by Western blotting with deglycosylation', *Physiol Rep*, 8: e14485.

Yates, Laura E., Aravind Natarajan, Mingji Li, Margaret E. Hale, Dominic C. Mills, and Matthew P. DeLisa. 2019. 'Glyco-recoded Escherichia coli: Recombineering-based genome editing of native polysaccharide biosynthesis gene clusters', *Metabolic Engineering*, 53: 59-68.

Yin, B., Y. Gao, C. Y. Chung, S. Yang, E. Blake, M. C. Stuczynski, J. Tang, H. F. Kildegaard, M. R. Andersen, H. Zhang, and M. J. Betenbaugh. 2015. 'Glycoengineering of Chinese hamster ovary cells for enhanced erythropoietin N-glycan branching and sialylation', *Biotechnol Bioeng*, 112: 2343-51.

Young, N. M., J. R. Brisson, J. Kelly, D. C. Watson, L. Tessier, P. H. Lanthier, H. C. Jarrell, N. Cadotte, F. St Michael, E. Aberg, and C. M. Szymanski. 2002. 'Structure of the N-linked glycan present on multiple glycoproteins in the Gram-negative bacterium, Campylobacter jejuni', *J Biol Chem*, 277: 42530-9.

Zacchi, L. F., and B. L. Schulz. 2016. 'N-glycoprotein macroheterogeneity: biological implications and proteomic characterization', *Glycoconj J*, 33: 359-76.

Zeng-Sheng, Han, Qing-Wang Li, Zhi-Ying Zhang, Yong-Sheng Yu, B. Xiao, S. Y. Wu, Zhong-Liang Jiang, H. Zhao, R. Zhao, and J. Li. 2008. 'Adenoviral vector mediates high expression levels of human lactoferrin in the milk of rabbits', *Microb Biotechnol*, 18: 153-59.

Zheng, Z., R. Okada, H. Kobayashi, T. Nagaya, J. Wei, Q. Zhou, F. Lee, T. K. Bera, Y. Gao, W. Kuhlman, C. H. Tai, and I. Pastan. 2020. 'Site-Specific PEGylation of Anti-Mesothelin Recombinant Immunotoxins Increases Half-life and Antitumor Activity', *Mol Cancer Ther*, 19: 812-21.

Bon, C., T. Hofer, A. Bousquet-Melou, M. R. Davies, and B. F. Krippendorff. 2017. 'Capacity limits of asialoglycoprotein receptor-mediated liver targeting', *MAbs*, 9: 1360-69.

Bunn, H. F. 2013. 'Erythropoietin', *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3: a011619.

Caval, T., W. Tian, Z. Yang, H. Clausen, and A. J. R. Heck. 2018. 'Direct quality control of glycoengineered erythropoietin variants', *Nat Commun*, 9: 3342.

Ghezlou, M., F. Mokhtari, A. Kalbasi, G. Riazi, H. Kaghazian, R. Emadi, and A. R. Aref. 2020. 'Aggregate Forms of Recombinant Human Erythropoietin With Different Charge Profile Substantially Impact Biological Activities', *J Pharm Sci*, 109: 277-83.

- Jelkmann, W. 2007. 'Erythropoietin after a century of research: younger than ever', *Eur J Haematol*, 78: 183-205.
- Lappin, T. R., and F. S. Lee. 2019. 'Update on mutations in the HIF: EPO pathway and their role in erythrocytosis', *Blood Rev*, 37: 100590.
- Liao, C., and Q. Zhang. 2020. 'Understanding the Oxygen-Sensing Pathway and Its Therapeutic Implications in Diseases', *Am J Pathol*, 190: 1584-95.
- Murakami, M., T. Kiuchi, M. Nishihara, K. Tezuka, R. Okamoto, M. Izumi, and Y. Kajihara. 2016. 'Chemical synthesis of erythropoietin glycoforms for insights into the relationship between glycosylation pattern and bioactivity', *Science advances*, 2.
- Peng, B., G. Kong, C. Yang, and Y. Ming. 2020. 'Erythropoietin and its derivatives: from tissue protection to immune regulation', *Cell Death Dis*, 11: 79.
- Ramakrishnan, R., W. K. Cheung, M. C. Wacholtz, N. Minton, and W. J. Jusko. 2004. 'Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of recombinant human erythropoietin after single and multiple doses in healthy volunteers', *J Clin Pharmacol*, 44: 991-1002.
- Shi, X., J. Yang, H. Zhu, L. Ye, M. Feng, J. Li, H. Huang, Q. Tao, D. Ye, L. H. Sun, B. N. Sun, C. R. Sun, G. Han, Y. Liu, M. Yao, P. Zhou, and D. Ju. 2013. 'Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human EPO-Fc fusion protein in vivo', *PLoS One*, 8: e72673.
- Uversky, V. N., and E. M. Redwan. 2016. 'Erythropoietin and co.: intrinsic structure and functional disorder', *Mol Biosyst*, 13: 56-72.
- Vocanec, D., T. Prijatelj, N. Debeljak, and T. Kunej. 2019. 'Genetic variants of erythropoietin (EPO) and EPO receptor genes in familial erythrocytosis', *Int J Lab Hematol*, 41: 162-67.
- Yasuoka, Y., T. Fukuyama, Y. Izumi, Y. Nakayama, H. Inoue, K. Yanagita, T. Oshima, T. Yamazaki, T. Uematsu, N. Kobayashi, Y. Shimada, Y. Nagaba, M. Mukoyama, T. Yamashita, Y. Sato, J. M. Sands, K. Kawahara, and H. Nonoguchi. 2020. 'Erythropoietin production by the kidney and the liver in response to severe hypoxia evaluated by Western blotting with deglycosylation', *Physiol Rep*, 8: e14485.
- Zivot, A., J. M. Lipton, A. Narla, and L. Blanc. 2018. 'Erythropoiesis: insights into pathophysiology and treatments in 2017', *Mol Med*, 24: 11.