

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**  
**Y AMBIENTALES**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**



**BIOPROCESO PARA LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS**  
**MONOCLONALES CONTRA UN TIPO DE CÁNCER DE MAYOR**  
**PREVALENCIA EN LA CIUDAD DE IBARRA.**

PLAN DE TRABAJO DE TITULACIÓN PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

**AUTORA:**

ANDREA VANESSA BASTIDAS VALLEJO

**DIRECTORA:**

Ing. ANDREA CHILQUINGA MSc.

**Ibarra – Ecuador**

**2023**

# UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN

CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

ESCUELA DE INGENIERÍA EN

BIOTECNOLOGÍA


## **“BIOPROCESO PARA LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA UN TIPO DE CÁNCER DE MAYOR PREVALENCIA EN LA CIUDAD DE IBARRA”**

Trabajo de grado revisado por el Comité Asesor, por lo cual se autoriza su  
presentación como requisito parcial para obtener el Título de:

**INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

APROBADO:

Ing. Andrea Jazmín Chiliquina Quispe MSc.



**DIRECTOR**

FIRMA

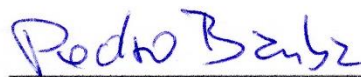
Ing. Santiago Zarate Baca MSc.



**MIEMBRO TRIBUNAL**

FIRMA

Blgo. Pedro Miguel Barba Estrella MSc.



**MIEMBRO TRIBUNAL**

FIRMA



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**  
**BIBLIOTECA UNIVERSITARIA**

**AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN**  
**A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**

**1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA**

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

<b>DATOS DE CONTACTO</b>			
<b>CÉDULA DE IDENTIDAD:</b>	1004382709		
<b>APELLIDOS Y NOMBRES:</b>	Bastidas Vallejo Andrea Vanessa		
<b>DIRECCIÓN:</b>	Ibarra, Víctor Mideros 2-121 y Dr. Raúl Montalvo. Junto al Mercado Mayorista (Barrio San Andrés)		
<b>EMAIL:</b>	avbastidasv@utn.edu.ec		
<b>TELÉFONO FIJO:</b>	2545568	<b>TELÉFONO MÓVIL:</b>	0997558813

<b>DATOS DE LA OBRA</b>	
<b>TÍTULO:</b>	Bioproceso para la producción de anticuerpos monoclonales contra un tipo de cáncer de mayor prevalencia en la ciudad de Ibarra.
<b>AUTOR (ES):</b>	Bastidas Vallejo Andrea Vanessa
<b>FECHA:</b>	7/03/2023
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
<b>PROGRAMA:</b>	<input checked="" type="checkbox"/> <b>PREGRADO</b> <input type="checkbox"/> <b>POSGRADO</b>
<b>TÍTULO POR EL QUE OPTA:</b>	Ingeniera en Biotecnología
<b>ASESOR /DIRECTOR:</b>	Ing. Andrea Chilingua MSc.

## CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrollo, sin los derechos de autores terceros, por lo tanto, la obra es original y es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 8 días del mes de marzo del 2023

EL AUTOR



Andrea Vanessa Bastidas Vallejo

C.I.: 1004382709

## **PRESENTACIÓN**

Yo, ANDREA VANESSA BASTIDAS VALLEJO como autor(a) de la Tesis Titulada **“BIOPROCESO PARA LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA UN TIPO DE CÁNCER DE MAYOR PREVALENCIA EN LA CIUDAD DE IBARRA”**, me hago responsable de los resultados, discusión, conclusiones y demás parte de la investigación; y pongo este documento como fuente de apoyo para consultas dirigidas a todos los estudiantes.

## **AGRADECIMIENTO**

Amado Dios, te agradezco por darme el maravilloso regalo de la vida y de tener una hermosa familia, ya que, con tu infinito amor, tu bondad y el fuego del espíritu santo me ayudas a sonreír y a luchar frente a las adversidades, iluminas mis días y me recuerdas que contigo lo tengo todo. También agradezco a mi Madre y Reina celestial la Virgen María, por ser mi socorro, mi intercesora, mi mejor compañía y por enseñarme que al imitar sus virtudes puedo amar más a su hijo Jesús.

A mis padres les agradezco de manera especial por ser mi apoyo en todos mis logros personales y académicos, por estar conmigo en mis aciertos, desaciertos, por brindarme su amor y cariño incondicional. También por luchar por mi bienestar, educación, salud, ser mis mejores guías y consejeros, por cultivar en mí valores éticos y morales, enseñarme a enfrentar la vida y sobre todo en formarme en la fe, en conocer y amar mi Iglesia Católica.

A mi querida hermana le agradezco por amarme, protegerme, comprenderme y animarme en los momentos más difíciles de mi vida. Por brindarme su apoyo, sus consejos y su paciencia. Además de ser un gran ejemplo de constancia, responsabilidad, rectitud, honestidad y lealtad. Te doy gracias por ser una gran hermana y amiga con quien he compartido momentos únicos y por mantenernos siempre unidas.

A mi querida abuelita, tíos y primos que de una u otra forma han estado pendientes de mi realización personal y profesional, dándome apoyo moral y espiritual para cumplir con mis planes de vida.

A todos mis amigos y compañeros con quienes he compartido momentos de alegrías y de tristezas, les agradezco por brindarme su apoyo, comprensión y motivación para mejorar día a día. Y de manera especial a la familia de Lazos de Amor Mariano por ser un soporte espiritual para el bien de mi alma, ayudándome a crecer en la fe, en virtudes y en una profunda devoción a la Virgen María.

Finalmente, a la UTN por abrirme las puertas para formar parte de esta gran casona universitaria; a mis queridos profesores que a lo largo de mi carrera me han transmitido sus amplios conocimientos para mi formación profesional, además de brindarme su apoyo y motivación para cumplir mis metas y crecer en mi formación personal.

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo se lo dedico a Dios, por permitirme alcanzar este logro, pues con Él lo puedo todo y sin Él no soy nada. También a la Virgen María por todas las bendiciones y gracias recibidas; a mi querido San José por enseñarme su constancia, paciencia y perseverancia para cumplir las actividades diarias con alegría.

Con mucho amor a mis padres, a mi hermana y abuelita ya que, gracias a su inmenso amor, sabios consejos y valores he podido llegar a cumplir uno de mis objetivos; les dedico todo mi esfuerzo en reconocimiento al sacrificio puesto en cada una de las etapas de mi vida personal y académica.

De manera especial a todas aquellas personas que padecen cáncer; pues gente luchadora y valiente como ustedes es la que inspira, motiva y da sentido a la vida, así que les expreso mi total apoyo, comprensión y solidaridad. ¡Mucho ánimo hombres y mujeres guerreros por la vida!

Y a todos aquellos que contribuyeron en el desarrollo de este trabajo, a quienes me brindaron su cariño, amor, confianza y total apoyo incondicional.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	<b>6</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>7</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>13</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>14</b>
<b>ÍNDICE DE ANEXOS</b> .....	<b>15</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>16</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>17</b>
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>18</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>18</b>
<b>1.1 Antecedentes</b> .....	<b>18</b>
<b>1.2 Planteamiento del problema</b> .....	<b>21</b>
<b>1.3 Justificación</b> .....	<b>23</b>
<b>1.4 Pregunta directriz</b> .....	<b>24</b>
<b>1.5 Objetivos</b> .....	<b>25</b>
1.5.1 Objetivo General.....	25
1.5.2 Objetivos específicos .....	25
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>26</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>26</b>
<b>2.1 Cáncer</b> .....	<b>26</b>
2.1.1 Aspectos generales .....	26
2.1.2 Características distintivas .....	26
2.1.3 Biología del cáncer .....	27
2.1.4 Mutaciones en cáncer .....	28
2.1.5 Factores de riesgo y causas del cáncer .....	28
2.1.6 Tratamientos para el cáncer .....	28



2.1.7 El cáncer en Ecuador .....	29
<b>2.2 Terapias dirigidas en el tratamiento del cáncer .....</b>	<b>30</b>
2.2.1 Función .....	30
2.2.2 Tipos de terapias dirigidas contra el cáncer.....	30
2.2.3 Medicamentos bioterapéuticos .....	31
<b>2.3 Anticuerpos monoclonales .....</b>	<b>31</b>
2.3.1 Aspectos generales .....	31
2.3.2 Estructura.....	31
2.3.3 Anticuerpos monoclonales terapéuticos .....	33
2.3.3.1 Obtención de anticuerpos monoclonales .....	33
2.3.3.2 Tipos de anticuerpos monoclonales.....	34
2.3.3.3 Mecanismo de acción .....	35
2.3.3.4 Aplicaciones de anticuerpos monoclonales .....	36
2.3.4 Diseño computacional .....	37
2.3.4.1 Interacción antígeno-anticuerpo .....	37
2.3.4.2 Especificidad .....	37
2.3.4.3 Modelamiento molecular.....	38
<b>2.4 Producción de anticuerpos monoclonales.....</b>	<b>38</b>
2.4.1 Aspectos generales .....	38
2.4.2 Proceso de producción.....	38
2.4.2.1 Sistemas de expresión.....	38
2.4.2.2 Fase upstream .....	39
2.4.2.3 Fase downstream .....	39
2.4.3 Estimación económica de bioprocesos .....	40
2.4.4 Patentabilidad de un anticuerpo monoclonal.....	40
<b>2.5 Mercado de los anticuerpos monoclonales .....</b>	<b>41</b>
2.5.1 Empresas biofarmacéuticas .....	41

2.5.2 Demanda en el mercado .....	41
<b>CAPÍTULO III .....</b>	<b>43</b>
<b>3. METODOLOGÍA.....</b>	<b>43</b>
<b>3.1 Descripción del área de estudio .....</b>	<b>43</b>
<b>3.2 Recopilación de información en casas de salud de Ibarra .....</b>	<b>43</b>
3.2.1 Registro de información obtenida en las dos casas de salud .....	43
3.2.2 Análisis de prevalencia e incidencia .....	44
<b>3.3 Diseño del anticuerpo monoclonal .....</b>	<b>44</b>
3.3.1 Criterios de selección de la diana terapéutica.....	44
3.3.2 Recopilación de información de secuencias de proteínas .....	46
3.3.3 Identificación y visualización de proteínas .....	47
3.3.4 Acoplamiento molecular.....	49
<b>3.4 Parámetros de bioproceso para la producción del anticuerpo monoclonal .....</b>	<b>52</b>
3.4.1 Selección de sistemas de expresión .....	52
3.4.2 Selección de parámetros del proceso Upstream y Downstream.....	52
<b>3.5 Proceso de obtención de patentes de biofármacos.....</b>	<b>53</b>
<b>3.6 Estimación económica .....</b>	<b>54</b>
3.6.1 Determinación de costos de equipos y reactivos .....	54
3.6.2 Estimación de costos de inversión y costos de producción .....	54
<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>56</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>56</b>
<b>4.1 Tipo de cáncer con mayor prevalencia e incidencia en la ciudad de Ibarra</b>	<b>56</b>
4.1.1 Hospital San Vicente de Paúl .....	56
4.1.2 Unidad Oncológica Provincial SOLCA Ibarra .....	59
4.1.3 Tratamientos para el cáncer utilizados en SOLCA Ibarra .....	61

4.1.4 Prevalencia e Incidencia de cáncer en pacientes de la ciudad de Ibarra	62
.....	
<b>4.2 Diseño del anticuerpo monoclonal .....</b>	<b>65</b>
4.2.1 Selección de la diana terapéutica.....	65
4.2.3 Búsqueda de secuencias y estructuras del antígeno y anticuerpo.....	72
4.2.4 Secuencia de aminoácidos y regiones de interés de <i>FGFR2</i> .....	73
4.2.5 Secuencia de aminoácidos de la región Fab del anticuerpo	
monoclonal .....	75
4.2.6 Secuencia de aminoácidos de la región Fc de otro anticuerpo	
monoclonal .....	78
4.2.7 Acoplamiento molecular.....	80
4.2.8 Análisis de Especificidad.....	83
<b>4.3 Bioproceso para la producción del anticuerpo monoclonal.....</b>	<b>85</b>
4.3.1 Sistemas de expresión.....	85
4.3.2 Parámetros de upstream.....	86
4.3.2.1 Línea Celular .....	86
4.3.2.2 Tipo de biorreactor.....	88
4.3.2.3 Modo de operación .....	89
4.3.2.4 Medio de cultivo.....	89
4.3.3 Parámetros de downstream .....	91
4.3.4 Análisis de heterogeneidad del producto.....	92
4.3.5 Patentes.....	92
4.3.6 Estimación económica.....	94
4.3.6.1 Costos de inversión.....	94
4.3.6.2 Costos de producción.....	95
4.3.6.3 Parámetros de producción .....	98
4.3.6.4 Proyección para la producción de anticuerpos monoclonales..	101
<b>CAPÍTULO V .....</b>	<b>103</b>

<b>5.CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>103</b>
<b>5.1 Conclusiones.....</b>	<b>103</b>
<b>5.2 Recomendaciones.....</b>	<b>104</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>105</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>119</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Marcas o características distintivas del cáncer..	26
<b>Figura 2.</b> Origen clonal del cáncer..	27
<b>Figura 3.</b> Número de casos de cáncer en 2020, ambos sexos, todas las edades..	29
<b>Figura 4.</b> Estructura de un anticuerpo.....	32
<b>Figura 5.</b> Arquitectura molecular de un anticuerpo de inmunoglobulina G1 (IgG1)....	33
<b>Figura 6.</b> Técnica de hibridoma para la obtención de mAbs..	34
<b>Figura 7.</b> Tipos de anticuerpos monoclonales terapéuticos.....	34
<b>Figura 8.</b> Proceso básico de upstream y downstream para la producción de anticuerpos monoclonales.....	40
<b>Figura 9.</b> Comportamiento en el mercado de anticuerpos monoclonales desde el año 2012 hasta el 2022.....	42
<b>Figura 10.</b> Visualización de FGFR2 y de la región Fab del mAb en Pymol.....	49
<b>Figura 11.</b> Visualización del proceso de acoplamiento molecular. ....	51
<b>Figura 12.</b> Tipos de cáncer diagnosticados en el HSVP en base a los 5 grupos etarios.	57
<b>Figura 13.</b> Tipos de cáncer diagnosticados en el HSVP en base al sexo.....	58
<b>Figura 14.</b> Tipos de cáncer diagnosticados en SOLCA Ibarra. ....	60
<b>Figura 15.</b> Prevalencia e incidencia de diferentes tipos de cáncer .....	63
<b>Figura 15.</b> Características del Receptor FGFR2.....	70
<b>Figura 16.</b> Secuencia de aminoácidos de la proteína <i>FGFR2</i> . ....	73
<b>Figura 17.</b> Visualización de la proteína FGFR2.....	74
<b>Figura 18.</b> Estructura de la región Fab del anticuerpo monoclonal. A) Secuencia de aminoácidos de la región Fab..	76
<b>Figura 19.</b> Estructura de la región Fc del anticuerpo monoclonal. 0.....	79
<b>Figura 20.</b> Top 10 de predicciones estructurales de acoplamiento generadas por PyDock. ....	81
<b>Figura 21.</b> Resultado BLASTp de similitud de secuencias con el mAb..	84
<b>Figura 22.</b> Panorama general de un bioproceso para la producción de anticuerpos monoclonales.....	100

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Terapias dirigidas más importantes empleadas para combatir el cáncer.....	30
<b>Tabla 2.</b> Tipos de anticuerpos monoclonales terapéuticos. ....	35
<b>Tabla 3.</b> Funciones efectoras de anticuerpos monoclonales. ....	36
<b>Tabla 4.</b> Criterios de selección de diana terapéutica.....	45
<b>Tabla 5.</b> Bases de datos biológicas para la investigación de diana terapéutica. ....	45
<b>Tabla 6.</b> Bases de datos de información de moléculas biológicas.....	47
<b>Tabla 7.</b> Parámetros de selección para el desarrollo de un bioproceso. ....	52
<b>Tabla 8.</b> Estimación de costos de capital fijo. ....	55
<b>Tabla 9.</b> Tratamientos utilizados el cáncer en el periodo 2019-2020 en SOLCA .....	61
<b>Tabla 10.</b> Criterios de selección dianas terapéuticas .....	67
<b>Tabla 11.</b> Dominios y regiones de interés de la proteína <i>FGFR2</i> .. ....	74
<b>Tabla 12.</b> Región Fab cadena pesada del anticuerpo monoclonal.....	77
<b>Tabla 13.</b> Región Fab cadena ligera del anticuerpo monoclonal.....	77
<b>Tabla 14.</b> Resultados acoplamiento de los modelos predichos.....	82
<b>Tabla 15.</b> Descripción de las regiones del mAb. ....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>Tabla 16.</b> Comparación entre células CHO y NSO para la producción de anticuerpos	86
<b>Tabla 17.</b> Especificaciones del medio de cultivo GIBCO CD DG44.....	90
<b>Tabla 18.</b> Instructivo para la concesión de licencias obligatorias sobre patentes.....	93
<b>Tabla 19.</b> Costo de inversión de la planta según método de Lang .....	94
<b>Tabla 20.</b> Costo de producción de la planta para producir anticuerpos monoclonales..	96
<b>Tabla 21.</b> Parámetros de producción estimados para 250kg de producto anual.....	98
<b>Tabla 22.</b> Proyección de producción en un periodo estimado de 5 años.....	101

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Base de datos del HSVP durante el periodo de tiempo 2019-2020.....	119
<b>Anexo 2.</b> Tabla de tipos de cáncer por grupo etario reportados en el HSVP - Ibarra .	120
<b>Anexo 3.</b> Tabla Tipos de cáncer por sexo reportados en el HSVP - Ibarra.....	124
<b>Anexo 4.</b> Tipos de cáncer reportados según número total de casos en SOLCA .....	127
<b>Anexo 5.</b> Vías de señalización de dianas terapéuticas .....	128
<b>Anexo 6.</b> Genes que interactúan con las dianas terapéuticas. ....	130
<b>Anexo 7.</b> Proceso de elaboración del medio de cultivo GIBCO DG44 .....	130
<b>Anexo 8.</b> Proceso de cromatografía de afinidad de proteína A.....	131
<b>Anexo 9.</b> Análisis de glicosilación mediante espectrometría de masas .....	132
<b>Anexo 10.</b> Criterios de selección de parámetros de producción de.....	133
<b>Anexo 11.</b> Costo de equipos e insumos necesarios para la producción .....	135
<b>Anexo 12.</b> Costo de reactivos bases empleados en el bioproceso .....	136
<b>Anexo 13.</b> Costo de reactivos para la producción de 1,3kg de producto .....	136

## RESUMEN

El cáncer se considera uno de los principales problemas que afectan a la salud humana, y puede ser causado por varios factores genéticos, ambientales, médicos y de estilo de vida. En Ecuador según los datos del GLOBOCAN se diagnosticaron 29.273 casos de cáncer en una población de 17.643.060 habitantes en el año 2020. Actualmente, existen terapias para combatir el cáncer como la radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal e inmunoterapia (anticuerpos monoclonales). Esta última ayuda al sistema inmune a destruir las células cancerosas, a diferencia de los fármacos convencionales como paclitaxel, docetaxel y cisplatino.

En la presente investigación se realizó una recopilación de información de casas de salud de la ciudad de Ibarra como el Hospital San Vicente de Paúl (HSVP) y la Unidad Oncológica Provincial SOLCA Ibarra para determinar el cáncer con mayor prevalencia. Posteriormente se realizó una revisión bibliográfica de las dianas terapéuticas que intervienen en el tipo de cáncer más prevalente y así proponer una construcción teórica de interacción antígeno-anticuerpo. Finalmente se propuso parámetros de producción de mAbs y un análisis presupuestario a nivel industrial.

Se determinó que el tipo de cáncer con mayor prevalencia en el periodo 2019-2020 fue el cáncer de mama con prevalencias de 13,5% (HSVP) y 36,3% (SOLCA). Por otra parte, se seleccionó a la diana terapéutica *FGFR2* (aminoácidos 151-246) para realizar una construcción teórica con la Región Fab de cadena pesada y ligera del mAb PDB:4WV1. Se obtuvo el mejor modelo de acoplamiento según el nivel de energía (-47, 57 kc/mol). Para el bioproceso se establecieron los siguientes parámetros teóricos de producción: gen *dihidrofolato reductasa*; *CHO cells*; biorreactor de tanque agitado; medio de cultivo GIBCO® CD DG44 y cromatografía de afinidad de proteína A. Por último, se estimó para la fase de Upstream, 250kg anuales de producto con un costo de producción de \$62.784,43 y un costo de inversión de \$677.280,50.

De esta manera, el estudio proporciona un panorama teórico general del proceso de producción de anticuerpos monoclonales, desde la selección de una diana terapéutica hasta la estimación económica de una planta de producción, con un alcance experimental en futuras investigaciones relacionadas con otros tipos de cáncer.

**Palabras clave:** anticuerpos monoclonales, diana terapéutica, cáncer, bioproceso, acoplamiento molecular.



## ABSTRACT

Cancer is considered one of the main problems affecting human health, and can be caused by several genetic, environmental, medical and lifestyle factors. In Ecuador, according to GLOBOCAN data, 29,273 cases of cancer were diagnosed in a population of 17,643,060 inhabitants in 2020. Currently, there are therapies to fight cancer such as radiotherapy, chemotherapy, hormonal therapy and immunotherapy (monoclonal antibodies). The latter helps the immune system to destroy cancer cells, unlike conventional drugs such as paclitaxel, docetaxel and cisplatin.

In the present research, a compilation of information from health centers in the city of Ibarra such as the HSVP and the Provincial Oncology Unit SOLCA Ibarra was carried out to determine the most prevalent cancer. Subsequently, a bibliographic review of the therapeutic targets involved in the most prevalent type of cancer was carried out in order to propose a theoretical construction of antigen-antibody interaction. Finally, mAbs production parameters and a budget analysis at industrial level were proposed.

It was determined that the type of cancer with the highest prevalence in 2019-2020 was breast cancer with prevalences of 13.5% (HSVP) and 36.3% (SOLCA). Moreover, the therapeutic target *FGFR2* (amino acids 151-246) was selected to perform a theoretical construction with the heavy and light chain Fab Region of the mAb PDB:4WV1. The best docking model was obtained according to the energy level (-47, 57 kc/mol). The following theoretical production parameters were established for the bioprocess: dihydrofolate reductase gene; CHO cells; stirred tank bioreactor; GIBCO® CD DG44 culture medium and protein A affinity chromatography. Finally, it was estimated for the upstream phase, 250 kg of product per year with a production cost of \$62,784.43 and an investment cost of \$677,280.50.

Thus, the study provides a general theoretical overview of the production process of monoclonal antibodies, from the selection of a therapeutic target to the economic estimation of a production plant, with an experimental scope in future research related to other types of cancer.

**Keywords:** monoclonal antibodies, therapeutic target, cancer, bioprocess, molecular docking.

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes

El cáncer se considera como un grupo de enfermedades que se caracterizan por un crecimiento descontrolado de células, dando paso a la progresión, expansión e invasión de dichas células en distintos órganos del cuerpo lo que se conoce como metástasis (Vispo, 2016). Es considerado la primera causa de muerte en personas mayores a 70 años, en 183 países analizados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2019. Por otra parte, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer junto con el Global Cáncer Observatory (GLOBOCAN) reportaron que en el año 2020 hubieron 19,3 millones de casos nuevos y 10 millones de muertes por cáncer en todo el mundo (Bray et al., 2020).

Según la investigación de Sung et al., (2021) en el año 2020 a nivel mundial los cánceres diagnosticados con mayor índice de casos se detallan en el siguiente orden: cáncer de mama (11,7% del total de casos), cáncer de pulmón (11,4%), cáncer colorrectal (10%), cáncer de próstata (7,3%) y cáncer de estómago (5,6%). En hombres el cáncer de pulmón presenta mayor número de muertes, seguido del cáncer de próstata, mientras que en mujeres corresponde el cáncer de mama, seguido del cáncer colorrectal y de pulmón. Por con siguiente, se conoce que las ciudades como Quito y Guayaquil presentan tasas de incidencia más altas de cáncer de mama, seguido de la ciudad de Cuenca (Caballero, 2021). Así como lo mencionaron Ruales & Checa,(2018), se espera que el sistema de salud tanto de Ecuador y América Latina aprovechen todos los recursos del estado para mejorar el acceso a la atención médica y mejorar los servicios de diagnóstico y tratamiento para pacientes oncológicos.

En cuanto al proceso de desarrollo de un cáncer, existen diferentes factores como: factores genéticos del individuo y la exposición a agentes ambientales; tales agentes convierten a las células normales en cancerosas (Mendelsohn et al., 2014). Dentro de las características que intervienen en el crecimiento tumoral y progresión metastásica se encuentran las siguientes: a) Mantenimiento de la señalización proliferativa; b) Evasión de los supresores del crecimiento; c) Activación de la invasión

y metástasis; d) Habilitar la inmortalidad replicativa; e) Inducción de angiogénesis y f) Resistencia a la muerte celular (Hanahan y Weinberg, 2011).

Para tratar esta patología se toma en cuenta ciertos aspectos como su ubicación, gravedad, factores de riesgo y tipo de tumor, para así aplicar algunos de los siguientes tratamientos más frecuentes: radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal e inmunoterapia (Korgaonkar y Yadav, 2019). Según Mello et al., (2015) este último tratamiento tiene como objetivo estimular al sistema inmunitario frente al cáncer, emplea sustancias producidas por el organismo o en el laboratorio para destruir a las células cancerosas. Dentro de las inmunoterapias se encuentran los anticuerpos monoclonales, que son un medio eficaz como terapia contra el cáncer debido a su acción farmacológica específica que emplea ciertos mecanismos de acción para destruir a las células malignas (Steinitz, 2019; Simpson y Caballero, 2014).

Así pues, los anticuerpos se pueden aislar mediante la técnica de hibridoma como lo menciona Meibohm, (2006), que consiste en inmunizar a un ratón con un antígeno específico. Estos anticuerpos se producen en células B especializadas y reaccionan frente al antígeno, estos se acumulan en el bazo, produciéndose de esta manera anticuerpos monoclonales (mAbs) terapéuticos. Tales anticuerpos tienen eficacia, seguridad y confiabilidad, que pueden beneficiar a los pacientes en el tratamiento y diagnóstico de ciertos problemas de salud, enfermedades autoinmunes y cáncer principalmente (Ziegelbauer y Light, 2008).

Según Shukla y Thömmes, (2010) con esta nueva tecnología, se han desarrollado avances en la ingeniería de proteínas como son los anticuerpos monoclonales terapéuticos, que se pueden producir a nivel industrial. Este proceso inicia con el diseño computacional *in silico* del acoplamiento molecular de proteínas para analizar alternativas de unión entre antígeno-anticuerpo y de esta forma conocer el grado de afinidad entre dichas proteínas (King, 2005). Así como lo menciona Tiller y Tessier, (2015) una de las propiedades más importantes de los anticuerpos es su capacidad para reconocer objetivos con alta afinidad y especificidad. Es por eso que el acoplamiento molecular es útil para identificar el sitio de unión del ligando en la proteína mediante estructuras cristalinas que permiten visualizar la unión entre las moléculas (Madej et al., 2014).

Se conoce que las grandes industrias biofarmacéuticas se encuentran en una mejora continua en cuanto a procesos de producción de biofármacos, en las que se toma en cuenta etapas de producción, fermentación y obtención del producto (Marissen, 2014). Por tanto, la primera etapa del desarrollo de anticuerpos monoclonales corresponde a la selección de sistemas de expresión que permitan la transcripción eficiente de genes de anticuerpos. La siguiente etapa consiste en el proceso denominado upstream en el cual la producción se realiza a pequeña escala mediante un cultivo en suspensión y por último el proceso downstream que permite la recolección del producto, caracterización y control de calidad (Gaughan, 2016; Birch y Racher, 2006).

Finalmente para determinar los costos de producción de proteínas terapéuticas, se emplean algunas estimaciones factoriales que permitan analizar los costos de inversión y de producción en una planta de desarrollo de biofármacos (Farid, 2007). Además, como lo menciona Breedveld, (2000) se espera que los costos de producción y ensayos clínicos con mAbs disminuyan en comparación con los costos de atención médica de las terapias actuales, para que sea accesible en la práctica clínica y mejorar los procesos de producción para tener mayor eficiencia y calidad en el producto. Por último, la capacidad de diseñar nuevas funcionalidades mediante el uso de nuevas estrategias de desarrollo de anticuerpos permitirá la expansión en el mercado de biofármacos en la industria (Ziegelbauer y Light, 2008).

## **1.2 Planteamiento del problema**

A nivel mundial el cáncer es considerado como una de las principales amenazas para la salud humana (Chen, 2019). Se estima que 15 de cada 100 muertes es debido a esta patología, donde el 70% de estas ocurren especialmente en países subdesarrollados (Ruales y Checa, 2018). En el Ecuador según datos del año 2020 se han diagnosticado 29.273 casos de cáncer considerando ambos sexos y todas las edades en un total de 17.643.060 habitantes (Global Cancer Observatory, 2020). Así mismo, se registra una incidencia de cáncer de 157,2 casos por 100.000 habitantes según la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC). Además, cerca de 28.000 personas son diagnosticadas con la enfermedad cada año según datos de la Sociedad Ecuatoriana de Oncología (Haro Salvatierra et al., 2019).

Por lo descrito, el cáncer es un problema de salud pública tanto a nivel nacional como internacional (Haro Salvatierra et al., 2019). Se estima que para el año 2030 el número de casos aumentará en un 70%, probablemente por un elevado crecimiento demográfico y un acelerado envejecimiento de la población (Paredes et al., 2017). Entre los principales factores que causan esta enfermedad se consideran: la obesidad, disminución de actividad física, antecedentes genéticos familiares, exceso de drogas y alcohol, entre otros (Bansal y Balas, 2020).

Debido al creciente número de casos, se han planteado terapias para tratarlo como las quimioterapias, radioterapias y terapia hormonal, que están enfocadas a la destrucción de las células cancerosas (Hafeez, Gan, y Scott, 2018). Estos tratamientos han sido exitosos en los últimos años. Sin embargo, presentan ciertas complicaciones ya que los fármacos para quimio y radioterapias afectan tanto a células sanas como a células cancerígenas, por lo que no se dirigen específicamente hacia las células malignas para destruirlas (Baxevanis, Perez, y Papamichail, 2009). Se ha evidenciado que las quimio y radioterapias presentan efectos secundarios complejos causando daños a largo plazo al corazón, pulmones, riñones y órganos genitales, debido al uso de los fármacos comúnmente empleados en estos tratamientos como son paclitaxel, docetaxel y cisplatino que ocasionan la caída de cabello, náuseas, anemia, estreñimiento, entre otros, lo que afecta a la calidad de vida del paciente debido a un sistema inmunológico debilitado (Baxevanis et al., 2009; Dicato y Cutsem, 2013).

Es por eso, que se han desarrollado nuevos tratamientos contra el cáncer que estimulan las defensas naturales del organismo para combatirlo, debido a mayor especificidad para destruir a las células cancerosas, estas terapias se conocen como inmunoterapias en las cuales se encuentran los anticuerpos monoclonales. (Chu et al., 2019). Sin embargo, en el Ecuador no es común el uso de estas terapias en las casas de salud pública ya que todavía no cuentan con los equipos y presupuestos necesarios para importar biofármacos, únicamente se conoce que en el país pocas empresas farmacéuticas han incursionado en la producción y desarrollo de bioterapéuticos, debido a altos costos de producción e importación (Cazar y Urquizo, 2017).

Actualmente existen clínicas y farmacéuticas en el país que proporcionan tratamientos como quimioterapias, hormonoterapias, inmunoterapias y anticuerpos monoclonales como Trastuzumab y Pertuzumab diseñados con la más alta tecnología (Coello, 2019); (Best Treatment, 2008). Sin embargo, muchos pacientes no cuentan con los recursos económicos para acceder a los mencionados tratamientos. Por lo que deben acceder a la atención pública donde la disponibilidad de estos tratamientos es limitada (Primicias, 2022).

Es así como, en algunas casas de salud aún se sigue administrando terapias convencionales especialmente en las instituciones públicas donde existe poca inversión en investigación. En este sentido, el Hospital de Especialidades Eugenio Espejo ha realizado un análisis presupuestario de implementación de Pertuzumab y Trastuzumab para tratar a uno de los tipos de cáncer con mayor número de casos, el cáncer de mama *HER2+* (Irigoyen et al., 2018).

Adicionalmente, en Ibarra son escasos estos estudios y únicamente las instituciones privadas son quienes involucran a sus pacientes con biofármacos. Por esta razón, se necesita incursionar en esta alternativa del uso de inmunoterapias que ha presentado buenos resultados. Por lo tanto, la construcción teórica de anticuerpos monoclonales es una buena propuesta para impulsar la implementación y producción a futuro de biofármacos en las instituciones de salud pública de la ciudad de Ibarra, y así contribuir en mejorar la calidad de vida de los pacientes.

### 1.3 Justificación

Frente al elevado número de casos de cáncer en Ecuador, el estudio de inmunoterapias como son los anticuerpos monoclonales (mAbs) resultan una buena alternativa para tratar diferentes patologías como el cáncer (Weiner et al., 2009). Tales moléculas son específicas para marcar y destruir a las células cancerosas (Ghaderi et al., 2018). También, se encargan de brindar protección al sistema inmunitario y a detener el crecimiento o diseminación de las células cancerosas en otras partes del cuerpo, a diferencia de las terapias convencionales (Milling et al., 2017).

Tales anticuerpos monoclonales tienen la capacidad de generar respuestas inmunitarias concretas frente a un antígeno tumoral (Taefehshokr et al., 2020; Weiner et al., 2009). En varios casos se combinan quimioterapias con anticuerpos monoclonales para alcanzar respuestas inmunes más altas a comparación de tratamientos convencionales que destruyen a las células malignas pero también a células sanas (Chu et al., 2019). Por eso, se han diseñado y aprobado a nivel mundial varios anticuerpos monoclonales para interactuar con blancos específicos y tratar una variedad de cánceres (Instituto Nacional del Cáncer, 2019).

En cuanto a los efectos secundarios, se estima que estos son más controlables como la reacción alérgica y síntomas pseudogripales que generalmente son poco frecuentes en los pacientes (Hafeez et al., 2018). Las principales ventajas que han demostrado son mayor homogeneidad, reproducibilidad y escalabilidad debido a que se puede producir a nivel industrial y a un costo razonable. Además, es posible obtener productos de anticuerpos biosimilares que no tienen diferencias clínicamente significativas con el producto de referencia y permiten reducir los costos, así brindar el acceso de un mayor número de pacientes a tratamientos biológicos de calidad (Ecker et al., 2015).

De esta manera, es necesario el uso de herramientas bioinformáticas como método útil en el descubrimiento de nuevos fármacos por medio del análisis de fuerzas de interacción ligando-receptor, para proponer varias predicciones moleculares para el establecimiento de terapias basadas en anticuerpos monoclonales (Prieto-Martínez et al., 2018a). También, es importante el diseño de un bioproceso capaz de crear un ambiente

de crecimiento o uso óptimo del material celular para producción de proteínas terapéuticas a nivel industrial (Ortega Quintana et al., 2017).

Debido a esto, la presente investigación propone el establecimiento de un bioproceso teórico para la producción de anticuerpos monoclonales. Se toma en cuenta los procesos que conllevan al desarrollo de mAbs, la selección de una diana terapéutica, el proceso de acoplamiento molecular y análisis presupuestario para determinar la inversión y producción de anticuerpos monoclonales (Bhambure et al., 2011).

En consecuencia, la importancia de realizar una revisión y estimación económica de estos medicamentos biotecnológicos puede complementar el tratamiento del cáncer en pacientes diagnosticados bajo esta patología y a la vez ser un referente para futuras investigaciones experimentales en la ciudad de Ibarra.

#### **1.4 Pregunta directriz**

¿Es posible diseñar mediante un estudio teórico, un bioproceso para la producción de anticuerpos monoclonales contra un cáncer prevalente en la ciudad de Ibarra?



## **1.5 Objetivos**

### **1.5.1 Objetivo General**

Establecer un bioproceso para el desarrollo de anticuerpos monoclonales como inmunoterapia para pacientes oncológicos en la ciudad de Ibarra.

### **1.5.2 Objetivos específicos**

1. Determinar el tipo de cáncer con mayor prevalencia en la ciudad de Ibarra mediante recopilación de datos de instituciones de salud pública del Ecuador.
2. Diseñar el anticuerpo monoclonal específico para una diana terapéutica a través del análisis de bases de datos de secuencias.
3. Elaborar un diseño de un bioproceso para la producción de anticuerpos monoclonales.

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO TEÓRICO

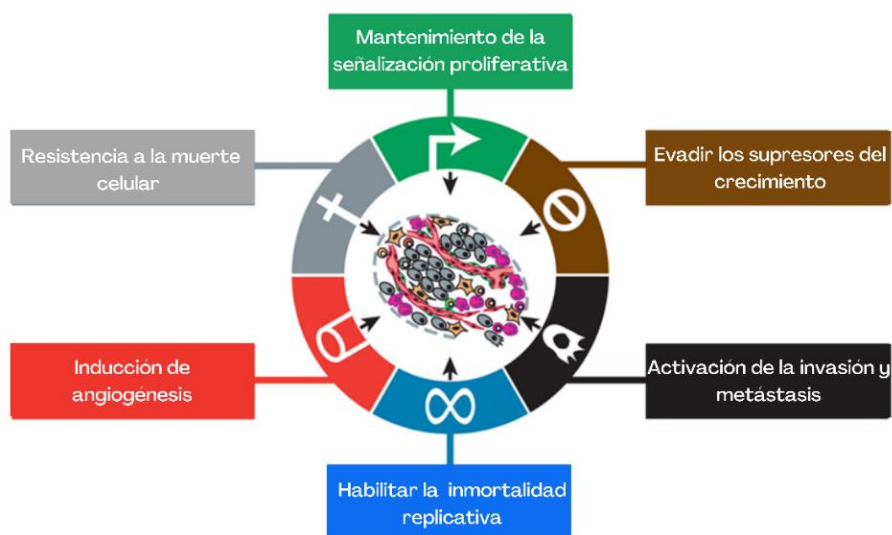
#### 2.1 Cáncer

##### 2.1.1 Aspectos generales

El cáncer es el crecimiento anormal de las células debido a cambios en la expresión génica que conduce a un proceso de proliferación y muerte celular, lo que puede provocar la invasión de tejidos sanos y causar metástasis en diferentes órganos debido a la migración de las células a través de los vasos sanguíneos donde iniciarán un nuevo desarrollo tumoral (Haberkorn, 2007).

##### 2.1.2 Características distintivas

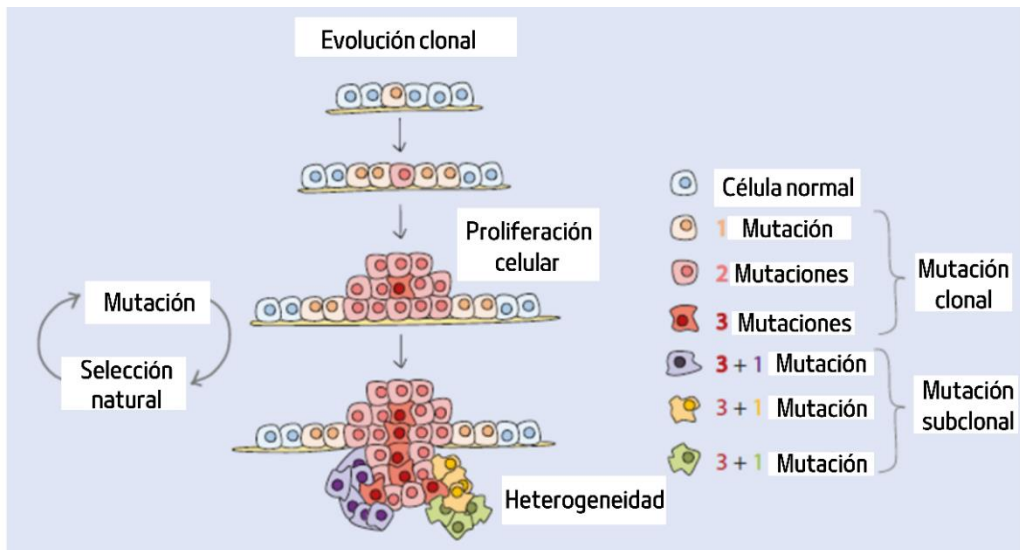
Existen 6 características distintivas del cáncer a nivel biológico (Figura 1) que comprenden todas las capacidades complementarias para el crecimiento tumoral y progresión metastásica (Hanahan y Weinberg, 2011). Estas características constituyen la base para la búsqueda de inhibidores de macromoléculas, dianas terapéuticas esenciales y así encontrar un enfoque para la selectividad y descubrimiento de fármacos (Moriarty et al., 2007).



**Figura 1.** Marcas o características distintivas del cáncer. Tomado de Hanahan y Weinberg, 2011.

### 2.1.3 Biología del cáncer

El cáncer es el resultado de ciclos repetidos de mutación y selección natural en una población de células somáticas (Figura 2). Por lo tanto, un clon original es capaz de evolucionar para adquirir varias mutaciones y diferentes clones pueden tener otras características y fenotipos que contribuyen a la diversidad celular como punto importante en la evolución (Roberts, 2019).



**Figura 2.** Origen clonal del cáncer. Tomado de Roberts, 2019.

El proceso de desarrollo del cáncer se divide en 3 etapas como se detalla a continuación:

**Iniciación:** Es la irreversible interacción de un carcinógeno con el ADN tisular. Este daño en el ADN es necesario, pero no suficiente, para un proceso de desarrollo tumoral (tumorigénesis). Es impulsado por una serie de enzimas presentes en varios tejidos humanos, donde los eventos iniciadores implican una acción directa sobre el genoma (Ruddon, 2007a). La respuesta celular frente a un daño del ADN es compleja y puede generar la reparación del daño, muerte celular por apoptosis o continuar con la proliferación celular (Merrill, 2002).

**Promoción:** es un proceso reversible que facilita la expresión de las células y conlleva al desarrollo de tumores benignos y malignos. Esta fase se conoce como la etapa de la proliferación celular y expansión clonal inducida por estímulos miogénicos (Ruddon, 2007a). Los productos químicos del proceso no intervienen con el ADN y los agentes que interactúan con los receptores de la membrana celular afectan a la expresión génica mediante proceso de transducción de señales (Merrill, 2002).

**Progresión:** es el proceso en que un tumor benigno se convierte en maligno y evoluciona aún más con un aumento de malignidad. El análisis molecular en varias etapas de progresión ha demostrado que las alteraciones en los genes supresores de tumores y los oncogenes se acumulan durante la progresión tumoral y metástasis, lo que se relaciona con la agresividad del tumor (Merrill, 2002).

#### **2.1.4 Mutaciones en cáncer**

Las alteraciones genéticas pueden incluir mutaciones puntuales, cromosómicas, translocaciones, deleciones de genes, pérdida de heterocigosidad e impronta genética. Todos estos problemas se deben a una inestabilidad genética que genera defectos en la replicación celular y disminución para reparar el ADN (Ruddon, 2007a).

Las células del cáncer tienen la habilidad de evadir la muerte celular programada a través de proteínas antiapoptóticas como *BCL-2*, así como también mutaciones inactivantes del gen p53 inducido por radiación y estrés oxidativo que produce radicales libres causantes del envejecimiento celular y aparición de enfermedades como el cáncer (Weinberg, 2014).

#### **2.1.5 Factores de riesgo y causas del cáncer**

El riesgo de cáncer se debe a ciertas implicaciones entre la genética del individuo y la exposición a agentes ambientales, tales agentes causante del cáncer convierten las células normales en cancerosas, este proceso se conoce como carcinogénesis y los agentes se denominan carcinógenos (Mendelsohn et al., 2014).

Esta patología se puede considerar como una enfermedad de envejecimiento, donde se evidencia que las mutaciones generadas en el ADN pueden deberse a la presencia de problemas genéticos, infecciones virales, bacterianas o parasitarias, radiaciones y agentes químicos que desembocan en el desarrollo de la enfermedad (Ruddon, 2007b).

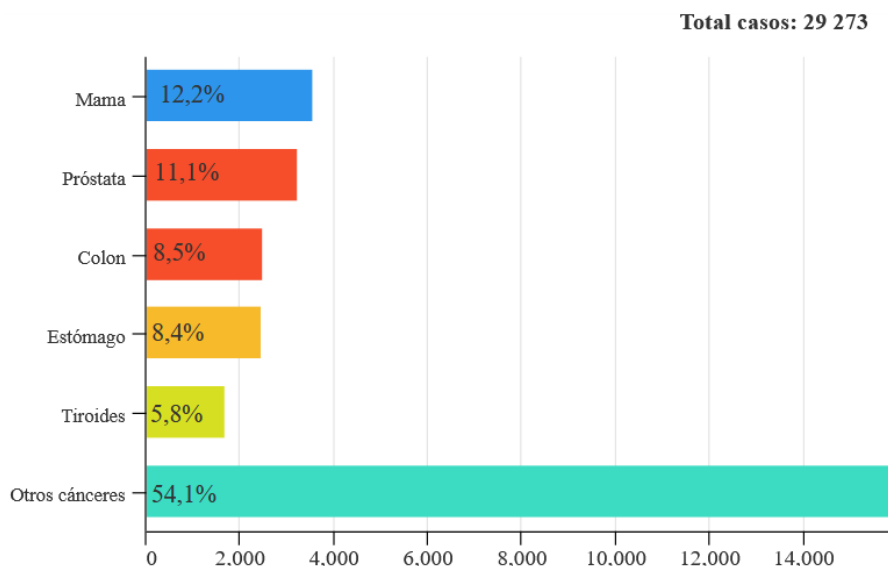
#### **2.1.6 Tratamientos para el cáncer**

Para tratar el cáncer se toma en cuenta aspectos como su ubicación, gravedad, factores de riesgo y el tipo de tumor. De acuerdo a las características antes mencionadas se puede utilizar alguno de los siguientes métodos: extirpación quirúrgica del tumor,

radioterapia con rayos de alta energía para tratar de destruir a la células cancerosa y reducir el tumor, quimioterapia que usa compuestos tóxicos que dificultan la replicación del ADN en la célula, terapia hormonal que usa fármacos para bloquear hormonas y evitar la formación del tumor, bloqueo de angiogénesis la cual puede bloquear el desarrollo de capilares eliminando el suministro de sangre, y terapia molecular en el que se incluyen las inmunoterapias que emplean fármacos o sustancias dirigidas a moléculas específicas que participan en el crecimiento y diseminación de las células cancerosas (Korgaonkar y Yadav, 2019).

### 2.1.7 El cáncer en Ecuador

En la Figura 3 se puede evidenciar los tipos de cáncer con mayor número de casos reportados en Ecuador en el año 2020. El tipo de cáncer con mayor número de casos corresponde al cáncer de mama con un 12,2 %, seguido del cáncer de próstata con 11.1 % y cáncer de colon con un 8,5 %. (Global Cancer Observatory, 2020)



**Figura 3.** Número de casos de cáncer en 2020, ambos sexos, todas las edades. Adaptado de Global Cancer Observatory, 2020.

El sistema de salud pública que posee el Ecuador y los países de América Latina buscan aprovechar los recursos disponibles para el acceso a la atención y servicios médicos en cuanto a la lucha contra el cáncer. Por lo tanto, la Estrategia Nacional para la Atención Integral del Cáncer en el país está encargada de implementar propuestas como la implementación de atención oncológica en todas las instituciones del Sistema

Nacional de Salud tanto público como privado mediante afiliación al seguro social para una mayor atención frente a esta situación. (Ruales y Checa, 2018).

## 2.2 Terapias dirigidas en el tratamiento del cáncer

### 2.2.1 Función

Son un tipo de agente terapéutico que se dirige a una diana molecular específica para generar el efecto terapéutico deseado. Para ello se emplean dianas farmacológicas como: proteínas, polisacáridos, lípidos y ácidos nucleicos característicos de algún tipo de cáncer, que permiten a estas terapias marcar a las células cancerosas para que sea más fácil que el sistema inmunitario las encuentre y las destruya (Mello et al., 2015).

### 2.2.2 Tipos de terapias dirigidas contra el cáncer

En la Tabla 1 se presentan algunas terapias dirigidas aprobadas con el objetivo de evitar el crecimiento y supervivencia de las células cancerosas.

**Tabla 1.** Terapias dirigidas más importantes empleadas para combatir el cáncer. Adaptado de Wagener et al., 2017; Comité de Comercio del Senado EE.UU, 2022.

Terapias dirigidas	Función
Terapias hormonales	Detienen el crecimiento de tumores sensibles a hormonas producidas por el cuerpo.
Inhibidores de la transducción de señales	Bloquean las actividades de moléculas que intervienen en la transducción de señales
Moduladores de expresión génica	Modifican la función de las proteínas que participan en la expresión génica
Inductores de apoptosis	Permiten que las células cancerosas sufran un proceso de muerte celular.
Inhibidores de angiogénesis	Bloquean el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos y así evitar el crecimiento de un tumor.
Inmunoterapias	Activan al sistema inmune para destruir a las células cancerosas, como los anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos en la superficie celular.

### **2.2.3 Medicamentos bioterapéuticos**

Son moléculas complejas que se obtienen de organismos vivos y su principio activo se adquiere de proteínas, insulina, hormonas, anticuerpos, entre otras. Estos medicamentos emplean técnicas como: ácido desoxirribonucleico recombinante (ADNr), reacción en cadena de polimerasa (PCR), procesos de producción de medicamentos que incluyen extracción de tejidos biológicos, técnicas de hibridoma y propagación de microorganismos en embriones o animales (Cazar y Urquizo, 2017)

## **2.3 Anticuerpos monoclonales**

### **2.3.1 Aspectos generales**

Los anticuerpos son proteínas producidas por el sistema inmune cuando detecta sustancias extrañas llamadas antígenos. Los anticuerpos son clave en la inmunidad humoral ya que tiene la capacidad de unirse a agentes externos con alta afinidad y especificidad. Existen 5 clases de anticuerpos: inmunoglobulina IgA, IgD, IgE, IgG e IgM (Tiller y Tessier, 2015).

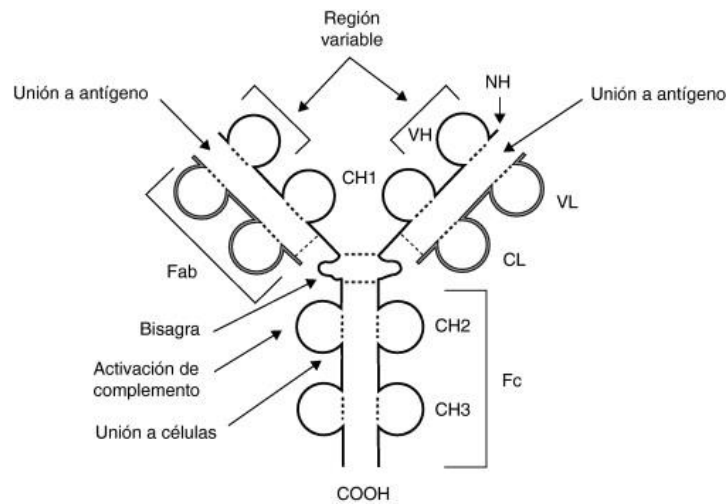
Las IgG tienen alta afinidad debido a que se diferencian en células de memoria de larga duración y se almacenan en tejidos y ganglios linfáticos para una respuesta rápida frente a una infección. Esta subclase es una de las más comunes ya que representa el 75% de inmunoglobulinas en el cuerpo y es la más empleada para la producción biotecnológica (Hanack et al., 2016).

Por otra parte, un anticuerpo monoclonal tiene la capacidad de unirse a dos epítomos en el mismo o en distintos antígenos, pueden emplearse como mediadores para dirigir a las células efectoras inmunes como NK y linfocitos T a las células tumorales con el fin de destruirlas (Carvajal et al., 2019).

### **2.3.2 Estructura**

Los anticuerpos son proteínas heterodiméricas compuestas por dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) conectadas por puentes disulfuro (Figura 4). Las dos cadenas ligeras contienen una región variable (VL) y una región constante (CL), mientras que las cadenas pesadas contienen una región variable (VH) y hasta tres distintas regiones constantes (CH1, CH2 y CH3) (Mendelsohn et al., 2014). El

fragmento de unión al antígeno (Fab) se localiza en el lugar donde se unen las cadenas H y L mediante uniones covalentes y no covalentes y al final de esa parte existe una región en ambas cadenas L llamada región variable (Fv) (García Merino, 2011)

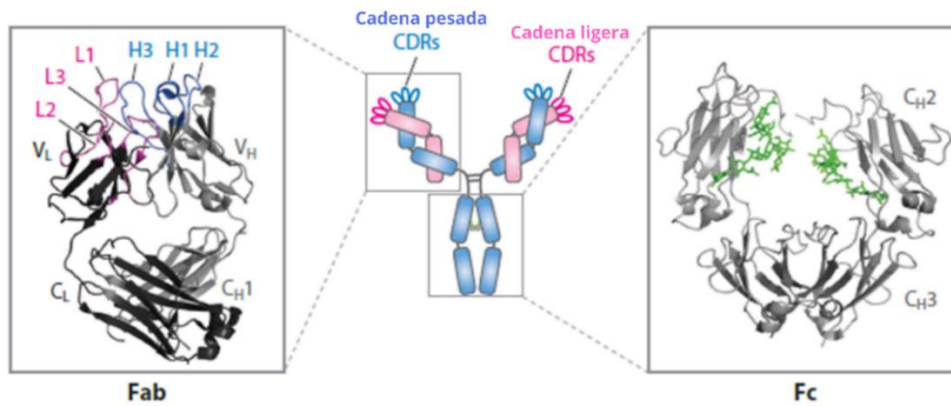


**Figura 4.** Estructura de un anticuerpo. Tomado de García Merino, 2011.

La forma de los anticuerpos se relaciona con la letra “Y” debido a los puentes disulfuro formados entre las 2 cadenas pesadas y ligeras, esta unión tiende a cristalizarse por eso se le conoce como “fragmento cristalizable” (Fc) la cual es responsable de: a) unión al receptor de células inmunes citotóxicas; b) activación del sistema de complemento; c) catabolismo del anticuerpo (Meibohm, 2006).

La Figura 5 muestra la estructura cristalina de un anticuerpo monoclonal *IgG1*, donde se encuentra el fragmento de unión a antígenos Fab (PDB: 3NZ8) y el fragmento cristalizable Fc (1E4K) tomando en cuenta los dominios y regiones constantes y variables de la arquitectura molecular de un mAb.



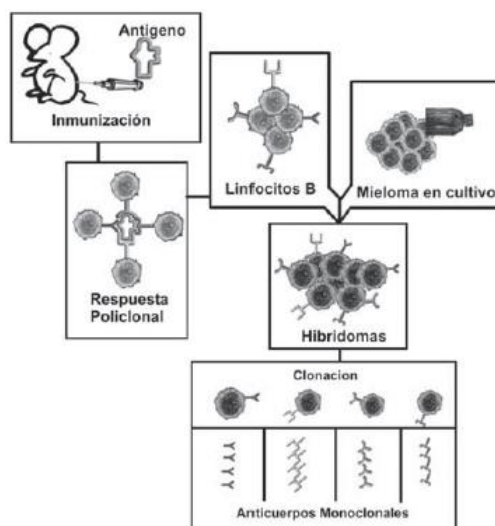


**Figura 5.** Arquitectura molecular de un anticuerpo de inmunoglobulina G1 (IgG1). Una IgG consiste en dos cadenas pesadas (azul) y dos cadenas ligeras (rosa). El Fab es compuesto por cadenas pesadas (VH) y ligeras (VL) y 2 dominios constantes (CH1 y CL). Los CDR en el dominio VH se denotan como H1, H2 y H3 (azul); los CDR en el dominio VL se denotan como L1, L2 y L3 (rosa). El Fc consta de dominios (CH2 y CH3) y glicanos en el Dominio CH2 (verde). Tomado de Tiller y Tessier, 2015.

### 2.3.3 Anticuerpos monoclonales terapéuticos

#### 2.3.3.1 Obtención de anticuerpos monoclonales

Cesar Milstein y Georges Kohler fueron los primeros en aislar a los anticuerpos monoclonales mediante la técnica de hibridoma que consiste en inmunizar a un ratón con un antígeno específico, produciendo una reacción inmune para generar linfocitos que secretan anticuerpos, los cuales reaccionan con un antígeno y se acumulan en el bazo (Figura 6). Posteriormente, los linfocitos B se aíslan y se fusionan con una célula de mieloma resultando una “célula hibridoma” que produce un anticuerpo dirigido contra un antígeno (Hanack et al., 2016).

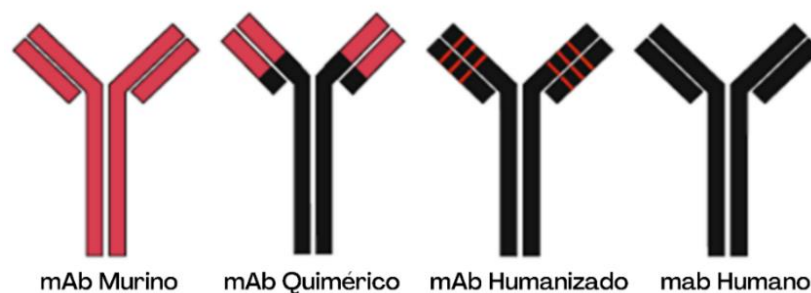


**Figura 6.** Técnica de hibridoma para la obtención de mAbs. Tomado de Carrasco-Yalán, 2021.

Finalmente, se realiza una prueba de sobrenadante para la unión de antígenos mediante ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), además de una prueba funcional para la selección y expansión de esos hibridomas producidos por los anticuerpos con las características deseadas (Meibohm et al., 2019). El anticuerpo obtenido se conoce como “mAbs” porque se deriva de un linfocito B original y por lo tanto todos son idénticos (clones), de esta manera el epítipo del antígeno se selecciona de varias líneas celulares de hibridomas (Meibohm, 2006).

### 2.3.3.2 Tipos de anticuerpos monoclonales

En la Figura 7 se muestran los tipos de anticuerpos monoclonales empleados para la aplicación terapéutica y en la Tabla 2 las características más relevantes de uno de ellos:



**Figura 7.** Tipos de anticuerpos monoclonales terapéuticos. Tomado de Guzman y Feuerstein, 2013.

**Tabla 2.** Tipos de anticuerpos monoclonales terapéuticos. Adaptado de Guzman y Feuerstein, 2013.

Tipos de mAbs	Características
Murinos	Primeros mAbs terapéuticos producidos por hibridomas y la aplicación terapéutica puede generar la formación de anticuerpos anti- ratón humanos (HAMA) contra los mAbs murinos, ocasionando una respuesta inmune con síntomas similares a la gripe.
Quiméricos	Contienen regiones constantes humanas y regiones variables de ratón y las regiones marco son los responsables de la respuesta inmune. Los anticuerpos producidos contra el mAb quimérico se conoce como anticuerpos humanos anti quiméricos (HACA).
Humanizados	Contienen partes de secuencia humana excepto los CDR que siguen siendo de origen murino. El sistema inmune puede producir anticuerpos humanos antihumanos (HAHA) que influyen en la farmacocinética y aclaramiento de los mAbs.
Humanos	Se emplean bibliotecas de ADNc de linfocitos B y visualización de fagos para producir mAbs completamente humanos, todavía se siguen realizando modificaciones para aumentar la afinidad con el antígeno.

#### 2.3.3.3 Mecanismo de acción

Los anticuerpos monoclonales ejercen su acción farmacológica mediante su interacción específica entre antígeno-anticuerpo. Pueden ejercer su función de agonista, antagonista o modulador. Los anticuerpos monoclonales emplean mecanismos para modulación del antígeno diana, apoptosis, liberación de inmunotoxinas para la activación de células T mediante moléculas bioespecíficas (Meibohm et al., 2019). En la Tabla 3 se muestran las cuatro funciones efectoras más importantes de los anticuerpos monoclonales en la terapia contra el cáncer.

**Tabla 3.** Funciones efectoras de anticuerpos monoclonales. Adaptado de Steinitz, 2019; Simpson y Caballero, 2014.

<b>Mecanismo de acción</b>	<b>Características</b>
Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC)	Las células inmunes atacan a las células objetivo como las células cancerosas induciendo apoptosis y señales de crecimiento negativas, aquí los macrófagos son capaces de opsonizar las células unidas a anticuerpos.
Citotoxicidad dependiente de complemento	El sistema de complemento conlleva a la lisis de las células presentadoras de antígenos induciendo reacciones de inflamación para eliminar a las células cancerosas. La glicoproteína C1q del sistema del complemento se une a las regiones Fc de 2 anticuerpos que deben haber formado previamente un dímero Fc.
Bloqueo de la interacción entre la sustancia fisiopatológica y el antígeno	Los fragmentos de anticuerpos muestran varios mecanismos de acción como el bloqueo entre la interacción receptor-ligando para una regulación del antígeno, modificación del crecimiento celular, inhibición de angiogénesis y apoptosis.
mAbs conjugados sin etiquetar	Los mAbs se conjugan con un fármaco citotóxico para ejercer su aplicación terapéutica. Además, se unen a las células objetivo con el antígeno en la superficie (ej. células tumorales), y así la sustancia citotóxica conjugada sólo se administra a estas células.

#### 2.3.3.4 Aplicaciones de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales han tenido mayor crecimiento en áreas terapéuticas y en técnicas de diagnóstico como la histopatología, técnicas de laboratorio como la citometría de flujo y tratamiento para diversas patologías humanas como se detallan a continuación:

**Oncología:** los anticuerpos monoclonales terapéuticos se han empleado para tratar el cáncer de mama principalmente, seguido de varios tumores, linfomas y leucemias.

**Enfermedades autoinmunes:** se han utilizado mAbs para tratar la artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, esclerosis múltiple, lupus, rechazo a trasplantes.

**Otras patologías:** enfermedades virales y tratamiento de intoxicación por fármacos (García Merino, 2011; Hollevoet y Declerck, 2017; García Ramos et al., 2011).

## 2.3.4 Diseño computacional

### 2.3.4.1 Interacción antígeno-anticuerpo

La interacción antígeno-anticuerpo es primordial para comparar la fuerza de unión y ver el grado de afinidad, tomando en cuenta la suma de todas las interacciones involucradas entre los enlaces no covalentes del anticuerpo y el antígeno. Puede haber casos donde los mAbs tengan más de un sitio de unión y los antígenos contengan más de un sitio antigénico en una superficie celular y, sin embargo, la unión multivalente puede ser posible (King, 2005).

Avances recientes en diseños computacionales permiten analizar si los ligandos que interactúan con el receptor se encuentran en el sitio de unión, en base a análisis de interacción hidrofóbica, electrostática, interacción entre hidrógenos y energías de solvatación para que la unión ligando-receptor entre las moléculas se lleve a cabo (Sisodiya et al., 2012).

### 2.3.4.2 Especificidad

La especificidad permite reconocer en un anticuerpo pequeñas diferencias antigénicas, las porciones inmunogénicas de la Ig se relacionan con la porción constante de la molécula en particular a la región Fc (Carvajal et al., 2019). La propiedad más importante de los anticuerpos es su capacidad para reconocer objetivos con alta afinidad y especificidad. Algunos de los métodos de diseño han utilizado injertos para imitar las interacciones naturales de proteínas, y enfoques de evolución dirigida para lograr especificidades para antígenos difíciles de atacar (Tiller y Tessier, 2015).

#### *2.3.4.3 Modelamiento molecular*

El modelamiento computacional es un método informático para predecir la interacción entre 2 moléculas generadas a través de un modelo de unión. El acoplamiento se lleva a cabo con una molécula pequeña (ligando) y una molécula grande (receptor) (Prieto-Martínez et al., 2018a).

El primer paso para el acoplamiento molecular consiste en identificar el sitio de unión del ligando en la proteína, de esta manera se puede identificar el sitio activo a través de las estructuras cristalinas del receptor unido a otros ligandos. El mayor número de secuencias estructurales y datos sobre anticuerpos es de dominio público, lo que permite obtener información necesaria sobre métodos computacionales para diseño de anticuerpos monoclonales logrando obtener los mejores modelos de predicción (Norman et al., 2020).

## **2.4 Producción de anticuerpos monoclonales**

### **2.4.1 Aspectos generales**

Nuevos avances en la ingeniería de proteínas han permitido el desarrollo de anticuerpos monoclonales con mejor eficacia terapéutica, debido a esto ha sido necesario establecer nuevos procesos de producción para obtener grandes cantidades de mAbs, para lo cual se ha tomado en cuenta propiedades bioquímicas y cromatográficas de un bioproceso (Shukla y Thömmes, 2010).

### **2.4.2 Proceso de producción**

#### *2.4.2.1 Sistemas de expresión*

Las primeras etapas del desarrollo de bioprocesos tienen que ver con la genética, es decir la manipulación del organismo huésped, de esta manera se puede llevar a cabo una transcripción eficiente de los genes de anticuerpos mediante el uso de vectores adecuados como sistemas de expresión (Birch y Racher, 2006). Posteriormente, es importante seleccionar una línea celular capaz de traducir de forma eficiente los ARNm de los anticuerpos para tener la suficiente capacidad de ensamblar al anticuerpo

tomando en cuenta los sitios de clonación para la expresión de mAbs y así mejorar la capacidad de la línea celular y mejorar la productividad (Marissen, 2014).

#### *2.4.2.2 Fase upstream*

Consiste en la elección y cultivo de células de mamíferos para producción a pequeña escala en un cultivo en suspensión con condiciones controladas. El cultivo se lleva a cabo usando volúmenes pequeños y cuando llega la etapa de escalado las células se transfieren a recipientes más grandes con mayor volumen de medio de cultivo (Gaughan, 2016).

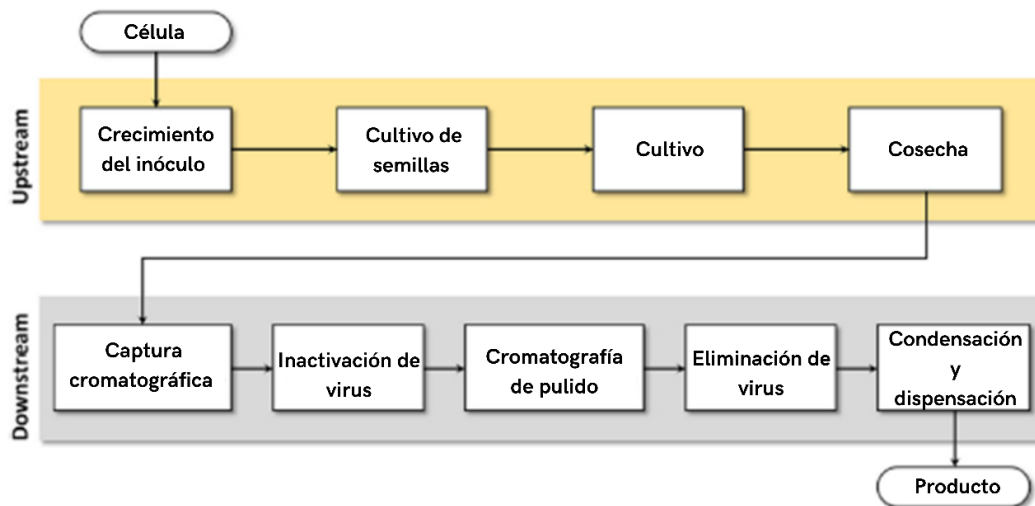
En esta etapa se toma en cuenta ciertas características para la composición del medio de cultivo y fermentación como: el pH, temperatura, concentración de oxígeno disuelto y parámetros del biorreactor que permitan un crecimiento y una productividad óptima (Figura 8). Además, se establecen parámetros para determinar la velocidad de crecimiento como la tasa de crecimiento celular, la productividad específica y el rendimiento del producto que se utilizan para describir el rendimiento del organismo (Doran, 2013).

#### *2.4.2.3 Fase downstream*

Constituye el proceso final de producción, para la recolección del producto, caracterización y control de calidad. Por lo tanto, constituye la etapa de producción a gran escala que estará determinada por la demanda en el mercado al que va destinado el fármaco (Gaughan, 2016).

Es importante mencionar que previo al proceso de escalado, se realiza un estudio que permita determinar características de: fermentación, métodos de aireación y pérdida de producto; si se completa esta fase se inicia el desarrollo del bioproceso a nivel industrial para el cultivo y purificación del producto (Doran, 2013).

Para obtener el producto, se aísla el anticuerpo monoclonal para ser sometido a procesos de filtración y purificación considerándose un paso importante en la economía global del proceso en función al rendimiento obtenido, pues cuanto mayor sea el producto mayor será el costo. En la Figura 8 se indican los pasos que conllevan al proceso de recuperación y obtención del producto. (Colin y BjØrn, 2006)



**Figura 8.** Proceso básico de upstream y downstream para la producción de anticuerpos monoclonales. Tomado de Badr et al., 2021.

### 2.4.3 Estimación económica de bioprocesos

Para determinar los costos de producción de proteínas terapéuticas como los anticuerpos monoclonales, se emplean estimaciones factoriales en el análisis de costos de proyectos anteriores y se relaciona con el costo del capital y costo del equipo de la planta. Además de los costos de validación y regulación en la industria biofarmacéutica, así como los costos de lotes, tiempos y procesos en base a la demanda del producto (Farid, 2007).

Así pues, los anticuerpos monoclonales presentan costos significativos en el proceso de identificación, optimización, producción y propiedad intelectual, debido a su complejidad estructural ya que estos medicamentos de proteínas de gran tamaño requieren de tecnologías que permiten el análisis de la afinidad, métodos de humanización, sistemas de expresión eficientes y líneas celulares necesarias según la funcionalidad (Ziegelbauer y Light, 2008).

### 2.4.4 Patentabilidad de un anticuerpo monoclonal

Para patentar anticuerpos monoclonales terapéuticos depende en gran medida de su capacidad de unirse con un epítipo dado en la superficie de un antígeno en interacción con el anticuerpo en forma genérica, policlonal o monoclonal (Chahar et al.,



2020a). Por lo tanto, depende de si dicha unión entre antígeno-anticuerpo es parte del estado de la técnica, y si se le proporciona una nueva característica al anticuerpo como una ventaja para reclamar el paso inventivo (Moorkens et al., 2020).

## **2.5 Mercado de los anticuerpos monoclonales**

### **2.5.1 Empresas biofarmacéuticas**

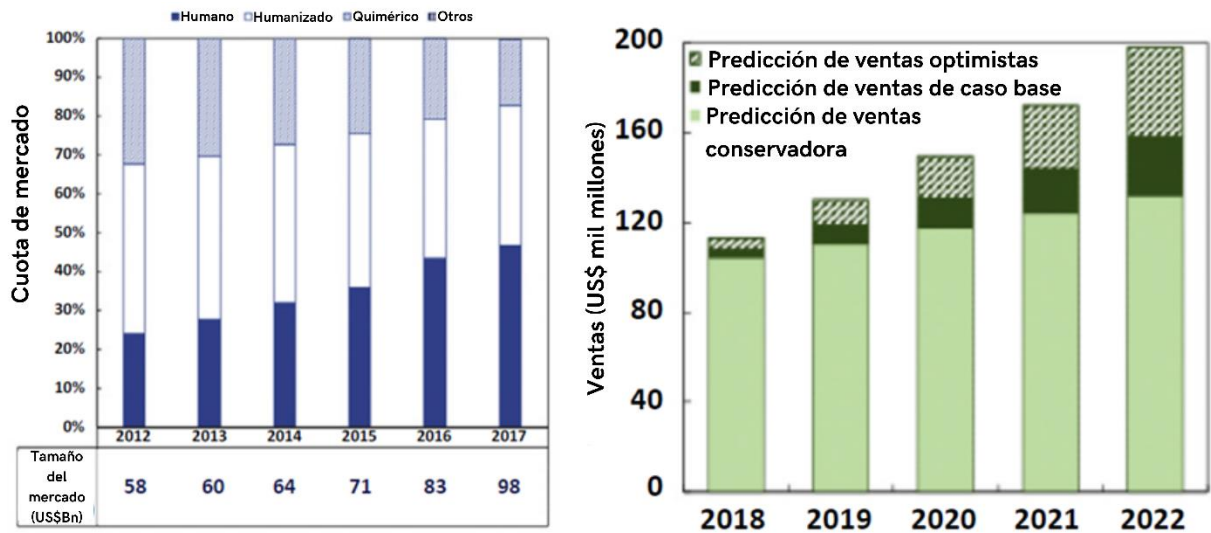
La biotecnología es una de las grandes industrias en el mundo que se encarga del desarrollo de biofármacos principalmente anticuerpos monoclonales que son específicos para tratar un tumor y se pueden encontrar como viales, soluciones inyectables y polvo liofilizado. Se han distribuido en Estados Unidos, Japón y Europa, liderando en el mercado las siguientes biofarmacéuticas: Hoffmann La Roche & CO AG F, Genentech Inc, Sanofi S.A, Regeneron Pharm Inc, Novartis AG, Abbott GMBH&CO KG, Biogen Ma INC, Abbvie Inc, Merck & CO Inc y Centocor Ortho Biotech Inc (Pereira et al., 2019).

### **2.5.2 Demanda en el mercado**

Los anticuerpos monoclonales han contribuido al tratamiento de varias enfermedades infecciosas y autoinmunes, pero de manera especial en el tratamiento para el cáncer, por tal motivo se encuentran entre los más caros de todos los medicamentos. Se estima que el costo anual por paciente puede llegar a los \$35.000 en anticuerpos monoclonales para tratar el cáncer, estos valores reflejan la costosa producción a gran escala en base a la demanda del mercado para producir aproximadamente 10-100 Kg/año (Farid, 2007).

En la Figura 9 se puede evidenciar la demanda de anticuerpos hasta el año 2017 donde se encontraron 22 empresas biofarmacéuticas que desarrollan mAbs comerciales, alcanzando un valor de \$98.000 millones en ventas con un crecimiento del 18,3% desde el 2016. Actualmente se espera un mayor crecimiento en el mercado de anticuerpos y

otras formas de medicamentos, por lo que se estima alcanzar ventas mayores a \$137 – 200 millones para el 2022 y así llegar a una tasa de crecimiento del 6,1 o 15% anual. (Grilo y Mantalaris, 2019)



**Figura 9.** Comportamiento en el mercado de anticuerpos monoclonales desde el año 2012 hasta el 2022. Tomado de Grilo y Mantalaris, 2019.

Los anticuerpos monoclonales que representan el 80% de mayor demanda en el mercado son: Avastin (bevacizumab), Herceptin (trastuzumab), Humira (adalimumab), Remicade (infliximab) y Rituxan (rituximab). Se proyecta que el mercado de anticuerpos crezca a \$30 mil millones dentro de 3 a 6 años para el área de oncología (Ziegelbauer y Light, 2008).

## CAPÍTULO III

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1 Descripción del área de estudio

El estudio se desarrolló en la ciudad de Ibarra, provincia de Imbabura. Se realizó una recopilación de información en bases de datos de dos casas de salud: Hospital San Vicente de Paúl (HSVP) y la Unidad Oncológica Provincial SOLCA Ibarra. Se estableció la colaboración entre la Universidad Técnica del Norte y las casas de salud antes mencionadas para el correspondiente acceso a los datos clínicos mediante una carta compromiso. La investigación se llevó a cabo en el periodo 2021-2022.

#### 3.2 Recopilación de información en casas de salud de Ibarra

La información recolectada en las bases de datos para el HSVP y SOLCA fueron: el tipo de cáncer, número de casos, datos clínicos como la edad, sexo, provincia y tratamientos para el cáncer. Es importante mencionar que los periodos de análisis fueron diferentes en ambas instituciones debido a la información proporcionada por parte de ambas instituciones, en el HSVP el periodo de información recolectada fue del 2019-2020, mientras que en SOLCA fue en el periodo 2002-2020.

##### 3.2.1 Registro de información obtenida en las dos casas de salud

En el HSVP se obtuvieron los datos de Medicina Interna y Consulta Externa para el año 2019 y 2020, inicialmente se asignaron códigos para cada tipo de cáncer (Anexo 1). La información se organizó por grupo etario y sexo de la siguiente manera: 0-11 años (niños); 12-17 años (adolescentes); 18-29 años (jóvenes); 30-64 años (adultos) y 65 años en adelante (tercera edad), de la misma manera se clasificó por sexo (masculino y femenino). Por último, se realizó una prueba de Chi cuadrado (*p value* de 0,05) usando el programa *InfoStat-Statistical* para analizar la existencia o no de independencia entre las variables de sexo y edad en relación con los diferentes tipos de cáncer.

Por su parte en la institución SOLCA, en base a la información recopilada, los tipos de cáncer se organizaron en gráficas de tendencia por periodo de tiempo (2002-2020) y número de casos diagnosticados de cáncer. Además, se recopiló información de tratamientos que se emplean en pacientes oncológicos, al ser la única institución que brinda tratamientos para el cáncer en la ciudad; por tanto, se obtuvieron datos del tipo de cáncer y número de pacientes que han recibido tales tratamientos.

### 3.2.2 Análisis de prevalencia e incidencia

Se analizaron los parámetros epidemiológicos de prevalencia e incidencia para definir el tipo de cáncer con mayor presencia en la ciudad de Ibarra, en las dos instituciones en estudio en base al periodo 2019-2020.

Se determinó la prevalencia como se muestra en la ecuación (1), en el que se consideró el número total de casos nuevos en un periodo de dos años en la población ibarreña. Por otro lado, para el cálculo de la incidencia como indica la ecuación (2), se determinó en base al número total de casos nuevos en el último año disponible en las bases de datos de las casas de salud (Tapia Granados, 2005).

<p><i>Prevalencia de la enfermedad X</i></p> $= \frac{N^{\circ} \text{ de personas con enf. X en un periodo}}{N^{\circ} \text{ total de personas en el mismo periodo}} \times \text{factor (100\%)}$	(1)
--	-----

<p><i>Incidencia de la enfermedad X</i></p> $= \frac{N^{\circ} \text{ de casos nuevos de la enf. X en un periodo}}{N^{\circ} \text{ total de personas en riesgo al comienzo del mismo periodo}} \times \text{factor (100\%)}$	(2)
---	-----

### 3.3 Diseño del anticuerpo monoclonal

#### 3.3.1 Criterios de selección de la diana terapéutica

Para definir una diana terapéutica, se realizó una recolección de información bibliográfica en base a estudios realizados en los años 2015-2020 sobre ensayos experimentales de tratamiento del cáncer en América del Norte y Sur, y específicamente

en Ecuador. La información se clasificó tomando en cuenta los criterios que se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Criterios de selección de diana terapéutica. Adaptado de Cazap et al., 2010; Alvarez-Gomez et al., 2021.

<b>Variable</b>	<b>Criterios de selección de la diana terapéutica</b>
Expresión en tejidos tumorales	Alteraciones en el cáncer más prevalente.
Ubicación subcelular	Membrana celular Medio intracelular
Vías metabólicas	Procesos que intervienen en proliferación celular.
Genes de interacción	Genes implicados en el desarrollo del cáncer.
Ligabilidad a base de anticuerpos	Capacidad de interacción farmacológica
Fármacos y candidatos clínicos	Fármacos aprobados en el mercado
Anticuerpos monoclonales	mAbs en el mercado mAbs en investigación para el cáncer más prevalente

Para la búsqueda de artículos científicos sobre el cáncer más prevalente en América del Norte y Sur se emplearon las siguientes bases de datos: Google académico, Scindirect, Bmccancer, Biomedcentral, Nature, Hindawi, NCBI, Springer Link, Academic Journals y Pubmed. Mientras que, para información de características de la diana terapéutica, se utilizaron las bases de datos biológicas que se detallan en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Bases de datos biológicas para la investigación de diana terapéutica. Tomado de Norman et al., 2020; Sisodiya et al., 2012; Konning et al., 2018.

<b>Nombre</b>	<b>Contenido</b>	<b>Enlace de referencia</b>
Uniprot	Repositorio de secuencias de proteínas e información funcional.	<a href="https://www.uniprot.org/">https://www.uniprot.org/</a>
National Cancer Institute	Información sobre las causas, prevención, diagnóstico y tratamiento del cáncer.	<a href="https://www.cancer.gov/espanol">https://www.cancer.gov/espanol</a>

Open Target Platform	Identificación sistemática y la priorización de posibles dianas terapéuticas farmacológicas.	<a href="https://platform.opentargets.org/">https://platform.opentargets.org/</a>
Drugbank	Información sobre medicamentos y objetivos de medicamentos.	<a href="https://go.drugbank.com/">https://go.drugbank.com/</a>
canSar	Datos de biología, química, farmacología, biología estructural, redes celulares y anotaciones clínicas de fármacos.	<a href="https://cansarblack.icr.ac.uk/">https://cansarblack.icr.ac.uk/</a>
ChEMBL	Datos químicos, bioactividad y genómica de fármacos.	<a href="https://www.ebi.ac.uk/chembl/">https://www.ebi.ac.uk/chembl/</a>
NCBI	Repositorio de información biotecnológica, biomédica y genómica.	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
Signor	Repositorio de proteínas humanas, sustancias químicas de relevancia biológica, estímulos y fenotipos.	<a href="https://signor.uniroma2.it/">https://signor.uniroma2.it/</a>
Pathway Commons	Datos de vías e interacciones biológicas, moleculares, genéticas y rutas metabólicas.	<a href="https://www.pathwaycommons.org/">https://www.pathwaycommons.org/</a>
Reactome	Análisis de reacciones, vías metabólicas y procesos biológicos.	<a href="https://reactome.org/">https://reactome.org/</a>

### 3.3.2 Recopilación de información de secuencias de proteínas

Para el diseño del anticuerpo monoclonal se tomaron en cuenta los criterios de la sección 3.3.1 para definir la diana que tenga mayor afinidad con un mAb, además, debe encontrarse en la membrana celular, ser capaz de reconocer un fármaco y producir una respuesta celular, y debe tener elevada interacción con el cáncer más prevalente, y a su vez que no existan biofármacos en el mercado (Simpson y Caballero, 2014).

El anticuerpo monoclonal tomado como referencia debe estar acoplado a la diana terapéutica, debe ser capaz de reconocer un epítipo dentro de un antígeno, en la cual se unirá para generar la interacción antígeno-anticuerpo y generar una predicción farmacológica como potencial terapéutico contra el cáncer más prevalente (García Ramos et al., 2011).

Para el diseño de construcción teórica, se tomó como referencia un anticuerpo monoclonal capaz de interactuar con la diana terapéutica. Posteriormente se analizaron las secuencias de aminoácidos de la región Fab del mAb, para conocer el sitio de acoplamiento con el antígeno (diana terapéutica) (Tiller y Tessier, 2015).

Así mismo, se realizó una revisión de las secuencias de aminoácidos de la región Fc de otro mAb de referencia para conocer el sitio de anclaje, unión e interacción con otros fármacos y moléculas. No precisamente se estableció una unión con todas las partes del anticuerpo monoclonal, más bien un análisis de la información reportada en las bases de datos que comprende el primer paso para el desarrollo de biofármacos *in silico* (Si et al., 2021).

En la Tabla 6 se muestran las bases de datos utilizadas para recopilación de información de secuencias de aminoácidos de la diana terapéutica y el anticuerpo monoclonal de referencia como se describió anteriormente.

**Tabla 6.** Bases de datos de información de moléculas biológicas. Tomado de Norman et al., 2020; Konning et al., 2018.

<b>Nombre</b>	<b>Contenido</b>	<b>Enlace de referencia</b>
Nextprot	Información de la función, ubicación, expresión e interacción de proteínas.	<a href="https://www.nextprot.org/">https://www.nextprot.org/</a>
Protein Data Bank	Estructura tridimensional de las proteínas y ácidos nucleicos.	<a href="https://www.rcsb.org/">https://www.rcsb.org/</a>
Therapeutic Antibody Database (Tabs)	Información de la OMS sobre secuencias y estructuras de anticuerpos terapéuticos.	<a href="https://tabs.craic.com/">https://tabs.craic.com/</a>
Abysis	Regiones y estructuras 3D de anticuerpos monoclonales.	<a href="http://www.abysis.org/abysis/index.html">http://www.abysis.org/abysis/index.html</a>

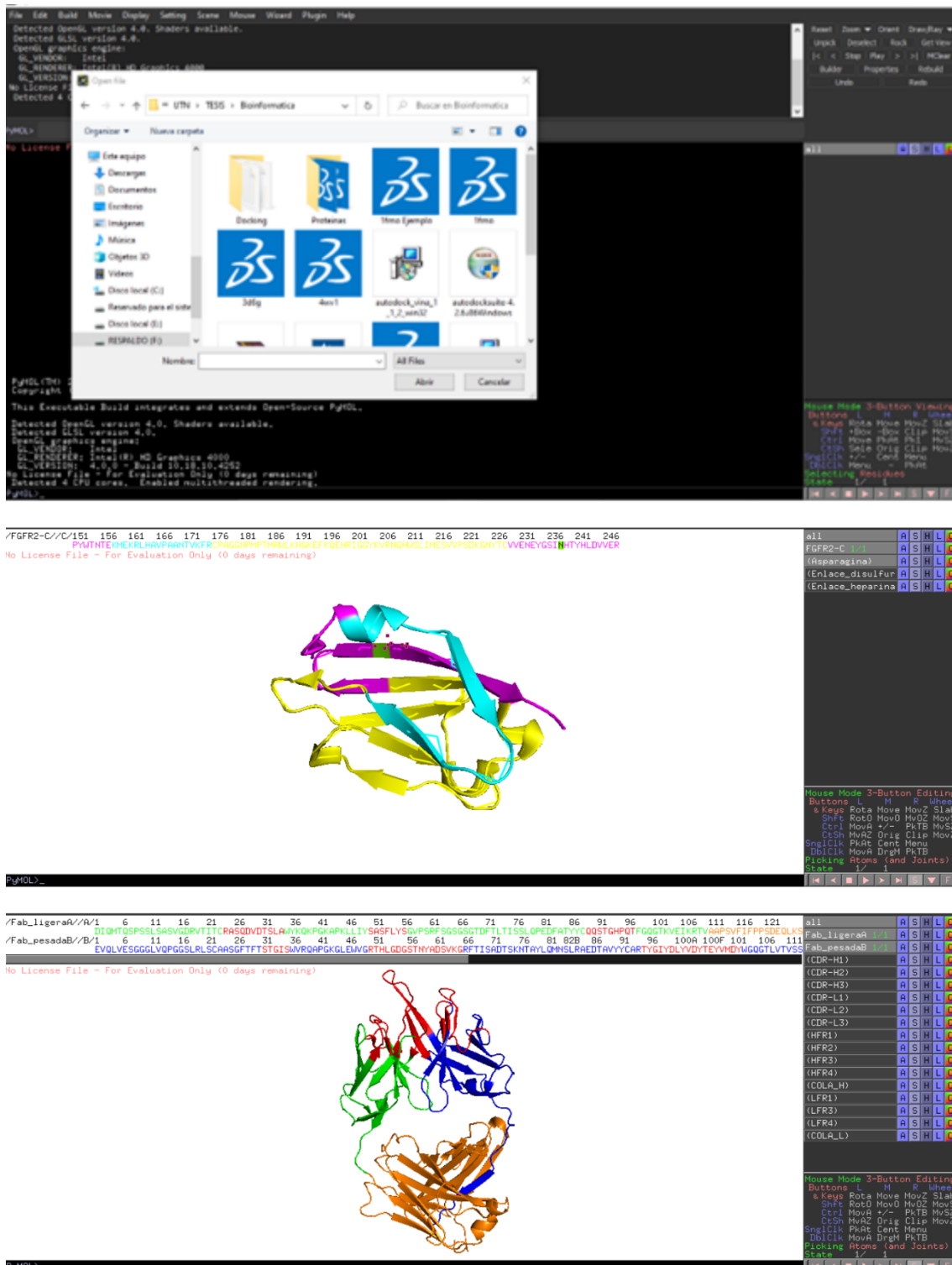
### 3.3.3 Identificación y visualización de proteínas

Con la información obtenida en la sección 3.3.2 se empleó el programa *Pymol* como herramienta de visualización de las moléculas en estructura 3D e identificación de las secuencias de aminoácidos en formato PDB tanto de la diana terapéutica y el

anticuerpo monoclonal de referencia (DeLano, 2019). A continuación, se describe el proceso, así como se muestra en la Figura 10:

1. Elegimos y cargamos los archivos en el programa en formato pdb.
2. Se utilizó las funciones de la parte derecha del programa para visualizar las moléculas: A: Acción; S: mostrar; H: ocultar; L: etiquetar; C: colorear.
3. Para identificar las regiones de la proteína como n-terminal y c-terminal se seleccionó los aminoácidos en la parte superior y se añadió etiquetas.
4. Para dividir las cadenas del anticuerpo en pesada (CH) y ligera (CL), se escribió el siguiente comando en la parte inferior del programa: `split_chains`.
5. Para visualizar en fondo blanco las estructuras de las moléculas, se seleccionó el botón `display>background>white`.





**Figura 10.** Visualización de *FGFR2* y de la región Fab del mAb en Pymol.

### 3.3.4 Acoplamiento molecular


Se realizó un acoplamiento molecular en Pydock Web para predecir la interacción entre las moléculas y analizar la posición más favorable de unión entre

ligando (anticuerpo monoclonal) y receptor (diana terapéutica), a partir de sus representaciones tridimensionales y la carga energética que determina la mejor afinidad posible (Prieto-Martínez et al., 2018b). El proceso se observa en la Figura 11 y se detalla a continuación:

1. Los archivos de la proteína y ligando se cargaron en el programa (<https://life.bsc.es/pid/pydockweb>) en formato PDB.
2. Se verificó el número de átomos y residuos de las moléculas y se seleccionó las cadenas del ligando y receptor disponibles para el acoplamiento.
3. Se eligieron las restricciones de residuos en el receptor y ligando en caso de que sea necesario.
4. La estructura de cada molécula en 3D fue evaluada para su confirmación previo a enviar el trabajo y por último se ejecutó el programa.
5. Como resultado, se visualizaron los 10 mejores modelos del complejo predicho en base a la interacción de energías entre receptor-ligando (Jiménez-García et al., 2013).

### Structure information

#### Receptor



Number of atoms : 3310  
Number of residues : 434

#### Job

Available receptor chains are: **A, B**  
Available ligand chains are: **C**

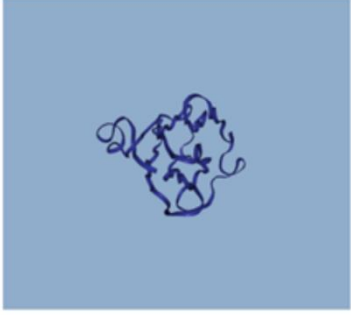
Receptor

 A (214)  
 B (220)

Ligand

 C (98)

#### Ligand



Number of atoms : 801  
Number of residues : 98

---

#### Receptor

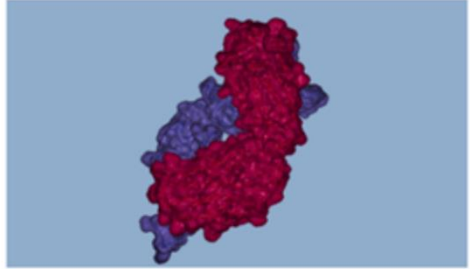
Number Of Atoms : 3310  
Number Of Residues : 434

#### Ligand

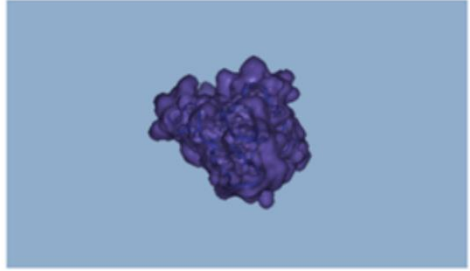
Number Of Atoms : 801  
Number Of Residues : 98

Project name: Acoplamiento molecular  
Contact email: avbastidasv@utn.edu.ec

Receptor chains (surface):  
A,B



Ligand chains (surface):  
C



---

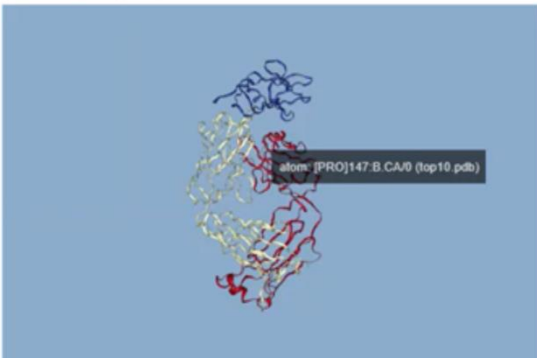
#### Energies predicted by pyDockWEB

Show  entries      Search:

Conf	Electrostatics	Desolvation	VdW	Total	Rank
48	-42.745	-5.025	1.982	-47.571	1
7897	-37.431	-9.315	12.994	-45.446	2
1693	-32.822	-6.806	-28.984	-42.526	3
927	-36.818	-6.898	31.741	-40.541	4
609	-28.077	-16.051	65.556	-37.572	5
1271	-31.959	-7.915	41.522	-35.722	6
90	-39.639	-4.671	91.254	-35.184	7
1694	-26.165	-9.431	6.494	-34.946	8
798	-37.491	-7.079	101.779	-34.393	9
9034	-31.310	1.489	-31.024	-32.924	10

#### Top 10 predictions by pyDockWEB

Model



atom: [PRO]147.B.CA0 (top10.pdb)

**Figura 11.** Visualización del proceso de acoplamiento molecular entre ligando-receptor en Pydock Web.

Posterior a eso, se realizó un análisis de especificidad mediante el programa web Tabs y BLAST. El análisis permitió reconocer las regiones afines entre el ligando y receptor y ver las similitudes entre secuencias de dichas moléculas.

### 3.4 Parámetros de bioproceso para la producción del anticuerpo monoclonal

La investigación se realizó a manera de revisión teórica, tomando en cuenta la necesidad de producción estimada de anticuerpos monoclonales según el número de casos de cáncer con mayor prevalencia en la ciudad de Ibarra. Además, de criterios que conllevan al desarrollo de un bioproceso en base a estudios experimentales.

#### 3.4.1 Selección de sistemas de expresión

Se planteó una comparación entre los sistemas de expresión más empleados en la industria farmacéutica que permiten la producción de anticuerpos monoclonales. Se tomaron en cuenta los siguientes criterios de selección: función, vectores plasmídicos, cepas celulares y capacidad de producción (Cacciatore et al., 2010).

#### 3.4.2 Selección de parámetros del proceso Upstream y Downstream

En la Tabla 7 se detallan los criterios de selección para definir el bioproceso teórico según el número de personas diagnosticadas con el cáncer más prevalente en la ciudad de Ibarra.

**Tabla 7.** Parámetros de selección para el desarrollo de un bioproceso. Tomado de Marissen, 2014; Chahar et al., 2020b.

	<b>Variable</b>	<b>Criterios</b>
<b>Upstream</b>	Línea Celular	Ventajas y desventajas
		Rendimiento
		Densidad celular

		Glicosilación
		Tasas de crecimiento
		Volumen
	Tipo de biorreactor	Parámetros de medición
		Título de producto
	Modo de operación	Estrategia de alimentación
		Producción
		Linaje celular
	Medio de cultivo	Cultivo en suspensión
		Expresión de proteínas
		Separación de componentes
<b>Downstream</b>	Métodos de Purificación	Eliminación de impurezas
		Cosecha del producto
<b>Heterogeneidad del producto</b>	Perfil de glicosilación	Concentración de producto
		Análisis de glicanos

### 3.5 Proceso de obtención de patentes de biofármacos

Se recopiló información de registros y documentos de entidades que otorgan patentes a nivel mundial y nacional. Con esta información se detallaron las características que rigen la patentabilidad en cuanto a especificaciones y atributos de calidad, así como también los requisitos para obtener las licencias de patente de biofármacos en Ecuador.

También, los costos de inversión requeridos para dicho proceso con la finalidad de conocer los trámites legales que implica el desarrollo de un biofármaco para ensayos experimentales (McCabe, 2009). Las instituciones en el que se obtuvo la información fueron las siguientes:

**Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA):** Agencia del gobierno de los Estados Unidos que se encarga de la regulación de alimentos, medicamentos, productos biológicos y derivados sanguíneos (Cockburn y Long, 2015).

**Agencia Nacional de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria (ARCSA):** institución en Ecuador que planifica y regula la gestión de vigilancia y control sanitario de productos de uso y consumo humano (Barrezueta, 2020).

### **3.6 Estimación económica**

En base al tipo de cáncer con mayor número de casos reportados en el Objetivo 1 se determinaron las dosis necesarias de producción, con la información reportada en el prospecto de un biofármaco comercial (Trastuzumab). Se tomó en cuenta 1kg de producto, el cual se estimó como dato referencial para el cálculo de los costos de producción, sin tomar en cuenta la fase preclínica y clínica.

El análisis se realizó según lo descrito por Han et al., (2016) en el que se analizaron los costos estimados de materia prima, equipos e instalación de una planta industrial; así como parámetros para la producción de proteínas terapéuticas en base a investigaciones experimentales.

#### **3.6.1 Determinación de costos de equipos y reactivos**

Se determinaron los costos unitarios y costos totales en base a las cantidades requeridas en ensayos experimentales en una planta industrial. Las empresas donde se recopiló la información se detallan a continuación: Fisher scientific (<https://www.fishersci.es/es/es/home.html>), eppendorf (<https://www.eppendorf.com/de-de/>), Merck (<https://www.sigmaaldrich.com/EC/es/>) y Lonza ([https://bioscience.lonza.com/lonza\\_bs/EC/en/](https://bioscience.lonza.com/lonza_bs/EC/en/)). Todos aquellos valores presentados en las páginas web con moneda en euros fueron convertidos en dólares americanos tomando de referencia el valor de conversión  $1 \text{ €} = 1,09 \text{ \$}$ .

#### **3.6.2 Estimación de costos de inversión y costos de producción**

Para determinar los costos de inversión se empleó el método de Lang. Este método permite conocer el costo de compra del equipo principal (EPC) en base a factores multiplicadores como se muestra en la Tabla 8. (Colin y BjØrn, 2006; Han et al., 2016).

**Tabla 8.** Estimación de costos de capital fijo. Tomado de Colin y BjØrn, 2006.

<b>Ítem</b>	<b>Factor multiplicador</b>
Costo de compra del equipo (EPC)	$1,00 \times \text{EPC}$
Instalación	$0,30 \times \text{EPC}$
Tubería	$0,50 \times \text{EPC}$
Instrumentación	$0,30 \times \text{EPC}$
Obras de construcción	$0,30 \times \text{EPC}$
Mejora del patio	$0,10 \times \text{EPC}$
Compra de terrenos	Precio asumido
Tasas, licencias	$0,04 \times \text{EPC}$
Planificación	$0,25 \times \text{EPC}$
Gestión del sitio	$0,05 \times \text{EPC}$
Arranque	$0,07 \times \text{EPC}$
Contingencias	$0,40 \times \text{EPC}$
Capital de explotación	$0,30 \times \text{EPC}$

Para la estimación de costos de producción se tomó de referencia el 1kg de producto en el que se asumió un porcentaje de pérdidas y ganancias del producto total (Farid, 2007). Finalmente, se realizó una proyección de costos de producción estimados para los próximos cinco años en base al valor de la inflación reportada en el año 2022.

Debido al alcance de la presente investigación no se contemplaron los costos de ensayos clínicos en el que se incluye la fase preclínica y clínica. Sin embargo, se tomó información de referencia de la demanda de mAbs en el mercado y costos estimados de ensayos realizados en humanos con la finalidad de aportar en la propuesta para futuras investigaciones.

## CAPÍTULO IV

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

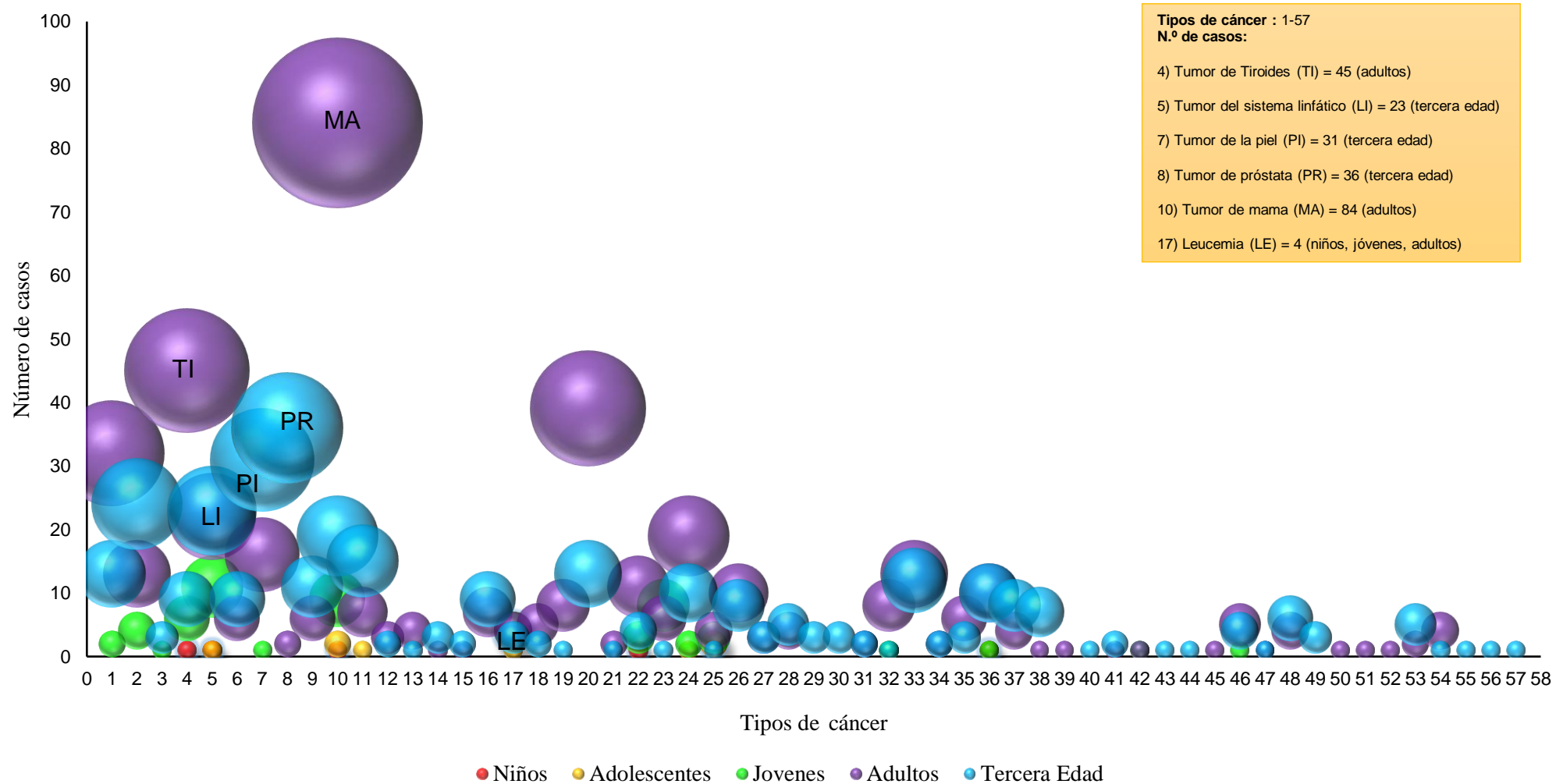
#### 4.1 Tipo de cáncer con mayor prevalencia e incidencia en la ciudad de Ibarra

##### 4.1.1 Hospital San Vicente de Paúl

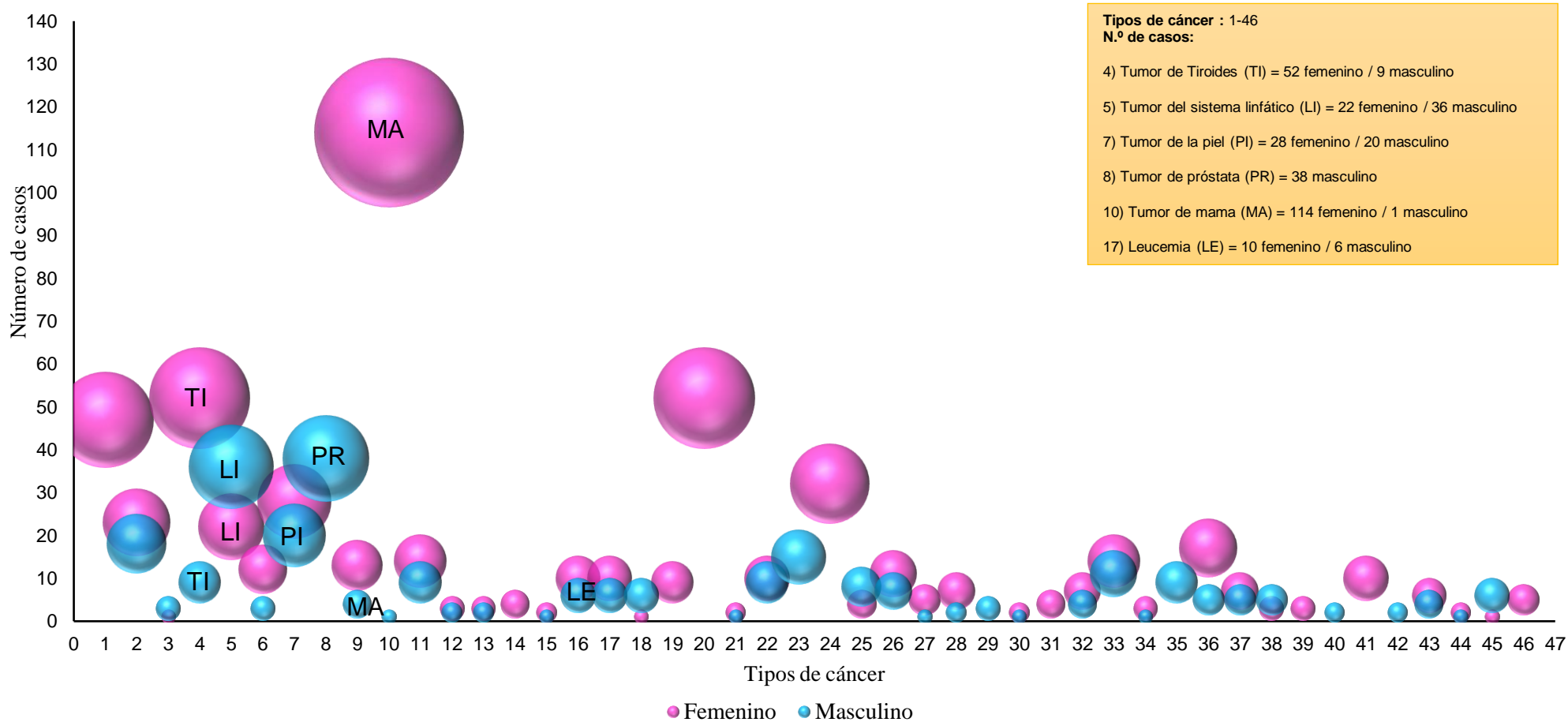
De acuerdo con la información de las bases de datos se evidenció la atención de 57 tipos de cáncer en el Hospital San Vicente de Paúl en el periodo de análisis 2019-2020. Se atendió 952 pacientes en las áreas de Medicina Interna y Consulta Externa, de los cuales 852 pacientes (89,5%) fueron diagnosticados con cáncer en el mismo periodo (Anexo 1).

En las Figuras 12 y 13 se muestra la organización de los tipos de cáncer por grupo etario y sexo respectivamente. Los 6 tipos de cáncer con mayor número de casos reportados en esta casa de salud son: tumor de mama con 115 casos reportados específicamente en mujeres adultas y un caso en un paciente masculino. 61 casos con tumor de tiroides, de los cuales 45 casos corresponden a pacientes adultos. 58 casos en tumor de sistema linfático, de los cuales 23 casos presentes en pacientes de la tercera edad. 48 casos en tumor en la piel y melanomas, de ellos 31 casos en pacientes de tercera edad. 38 casos con tumor en la próstata de los cuales 36 casos corresponden a pacientes de tercera edad y 16 casos de pacientes con leucemia, específicamente 4 casos en niños en edades de 0-11 años.





**Figura 12.** Tipos de cáncer diagnosticados en el HSVP en base a los 5 grupos etarios en el periodo 2019-2002 (Anexo 2). El tamaño de las esferas depende de mayor o menor número de casos reportados.



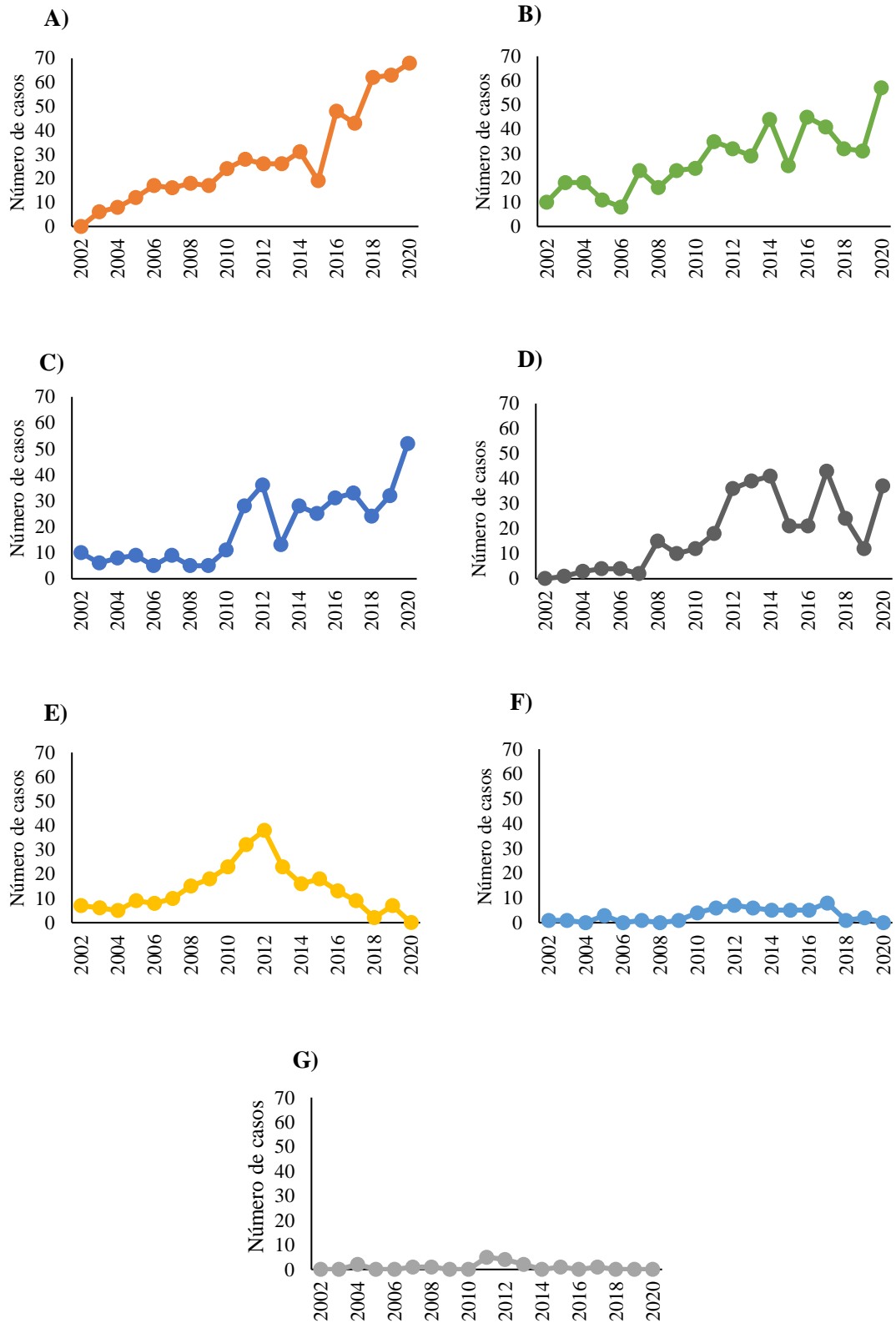
**Figura 13.** Tipos de cáncer diagnosticados en el HSVP en base al sexo. Los tipos de cáncer que no se muestran en la gráfica corresponden aquellos que tienen un paciente diagnosticado tanto en Masculino y Femenino como son: EB, PAL, UR, ENCI, VU, TF, MIO, LEN (codificaciones según tipo de cáncer - Anexo 3). El tamaño de las esferas depende de mayor o menor número de casos reportados.

Utilizando la prueba estadística de Chi cuadrado, se determinó que las variables del grupo etario y sexo (masculino-femenino) no están correlacionadas con el tipo de cáncer ( $\chi^2 = 2679$ ;  $gl = 2632$ ;  $p = 0,2568$ ). De acuerdo con el resultado, se puede considerar que los tipos de cáncer reportados se deben a factores del azar. Según Ruddon, 2007b menciona que los tipos de cáncer se diagnostican de forma independiente tomando en cuenta otros factores clínicos como ambiente, genética, alimentación, exposición, radiación, entre otros (Ruddon, 2007b).

#### **4.1.2 Unidad Oncológica Provincial SOLCA Ibarra**

En esta casa de salud, se recolectó un historial de 18 años (periodo 2002-2020), con un reporte de 7 tipos de cáncer, que se detallan en base a la observación de los datos recopilados.

En la Figura 14 y en el Anexo 4 se detallan un total de 532 casos en tumores de mama, donde se evidencia un mayor aumento a partir del año 2016 en adelante, por su parte los tumores de piel y melanomas con un total de 522 casos, de los cuales 57 casos se reportan en el año 2020 principalmente. Así también, los tumores ginecológicos con un reporte total de 370 casos y con mayor tendencia a partir del año 2014. Mientras que, los tumores de cabeza y cuello corresponden a 343 casos en total, específicamente en el año 2014 y 2017 con mayor tendencia. Por otra parte, los tumores mixtos presentan un total de 259 casos, de los cuales 38 casos se reportaron como mayor numero en el 2012 y a partir del año 2015 se muestra un descenso hasta el último año. Así mismo, los tumores de linfoma con un total de 56 casos, donde se evidencian 8 casos con mayor reporte en el año 2017. Finalmente, los tumores urológicos con un total de 17 casos, que se han mantenido durante todo el periodo de estudio, sin embargo, se destaca un pequeño aumento en el año 2012.



**Figura 14.** Tipos de cáncer diagnosticados en SOLCA Ibarra. El orden en número de aparición de las figuras se relaciona con aquellas patologías de mayor a menor número de casos, de la siguiente manera: A) Tumores mamarios, B) Tumores piel y melanomas, C) Tumores

ginecológicos, D) Tumores cabeza y cuello (Tiroides, Partiroides, Submaxilar), E) Tumores mixtos (Colon y Estómago), F) Tumores linfoma y G) Tumores urológicos.

Tomando en cuenta esta información, es posible que exista un sesgo en los datos obtenidos, ya que, se conoce que muchos pacientes que cuentan con Seguro Social IEES son transferidos a SOLCA Núcleo de Quito para realizarse aquellos tratamientos que no son posibles en Ibarra. De la misma manera los pacientes que no cuentan con Seguro Social IEES y son diagnosticados en el HSVP, son transferidos mediante trabajo social al Hospital Eugenio Espejo en Quito, un hospital de tercer nivel (Ministerio de Salud Pública del Ecuador , 2013).

Al igual que lo determinado en el HSVP, el cáncer de mama en SOLCA es la patología que tiene mayor número de casos diagnosticados, pues este ha tenido un incremento progresivo en los últimos años, a diferencia de los tumores de linfoma y tumores urológicos donde los casos son relativamente bajos. Sung et al., (2021) menciona que a nivel mundial el cáncer de mama es uno de los tumores más frecuentes y con mayor número de muertes en mujeres, resultado que se relaciona en la presente investigación con un reporte de tumores de mama con 115 casos y 131 casos en el HSVP y SOLCA respectivamente, en el periodo 2019-2020.

#### **4.1.3 Tratamientos para el cáncer utilizados en SOLCA Ibarra**

Se reportaron los medicamentos que se emplea en SOLCA para tratar el cáncer, mientras que en el HSVP no se presenta información de dichos tratamientos, ya que no cuentan con los antes mencionados para suministrar a sus pacientes. En la Tabla 9 se indica que los anticuerpos monoclonales más utilizados en SOLCA son Trastuzumab y Bevacizumab. Estos han sido usados principalmente para el tratamiento de tumores de mama y ovarios. Este tipo de inmunoterapia se combina con quimioterapias.

**Tabla 9.** Tratamientos utilizados el cáncer en el periodo 2019-2020 en SOLCA

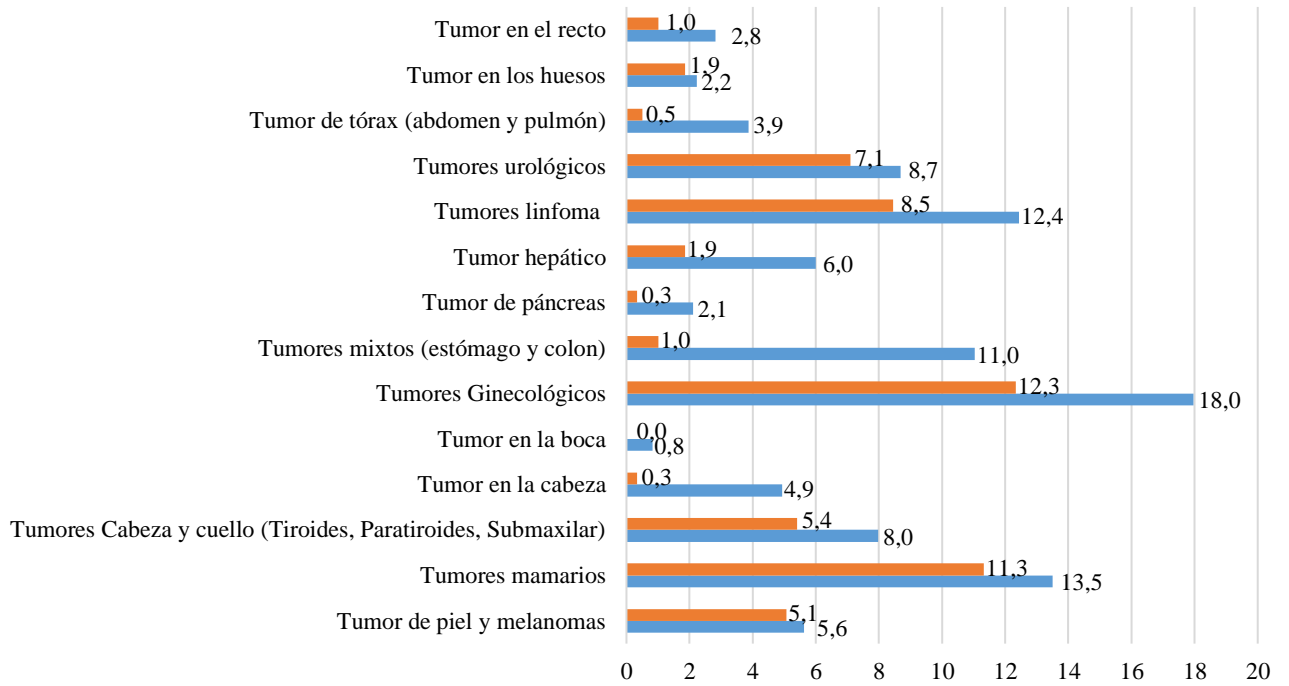
<b>Tipo de cáncer</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Nº de pacientes</b>
Tumor maligno de mama	Trastuzumab	8

	AC (doxorubicina y ciclofosfamida)	4
	Paclitaxel	6
	TAC (Taxotere, Adriamicina y ciclofosfamida)	2
Tumor maligno de mama/piel	Ácido zoledrónico	7
Melanoma maligno de piel	Dacarbazina	1
Tumor maligno de ovario	Bevacizumab	4
	<b>Total</b>	<b>32</b>

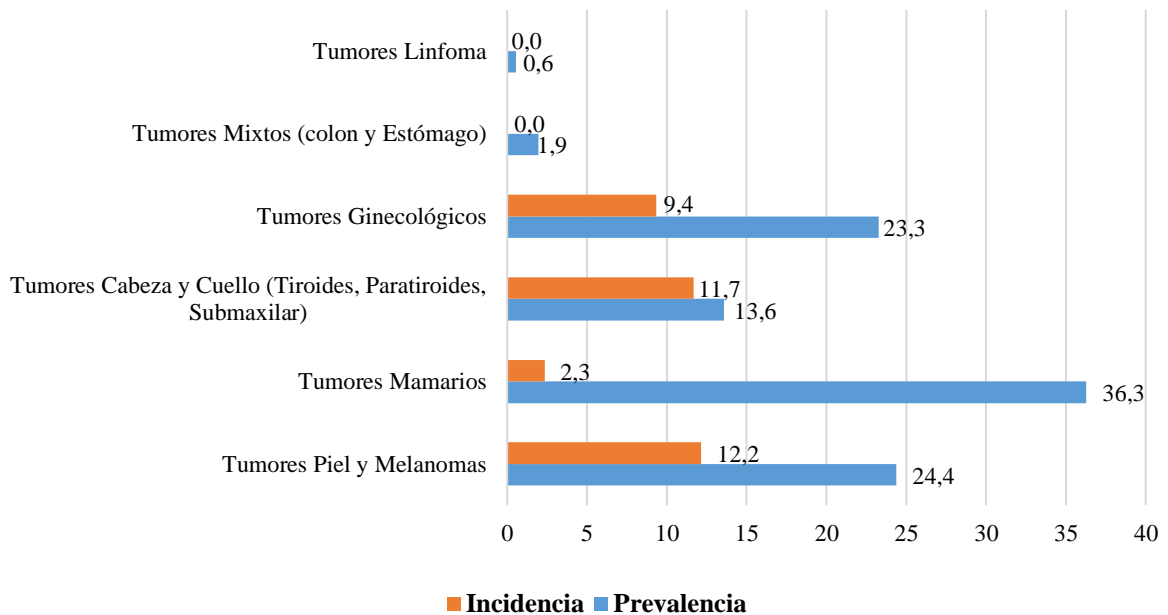
#### 4.1.4 Prevalencia e Incidencia de cáncer en pacientes de la ciudad de Ibarra

En la Figura 15 se muestran los datos de prevalencia e incidencia de diferentes tipos de cáncer en las dos casas de salud estudiadas durante el periodo 2019-2020. Es importante mencionar que se realizó una agrupación de tipos de cáncer del HSVP para realizar una comparación con los tipos de cáncer de SOLCA.

A)



B)



**Figura 15.** Prevalencia e incidencia de diferentes tipos de cáncer reportados en el periodo 2019-2020: A) Hospital San Vicente de Paúl; B) Unidad Oncológica Provincial SOLCA. Los datos del eje X indican el porcentaje de datos de prevalencia e incidencias de las dos casas de salud.

En la ciudad de Ibarra según información del Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC) se reportó hasta el año 2019 un total de 246.561 habitantes de los cuales el 48% son hombres y 52% son mujeres (Campoverde Merchán et al., 2020). En la investigación se determinaron que los tipos de cáncer reportados en la Figura 15 con mayores prevalencias en el periodo 2019-2020 corresponden el Hospital San Vicente de Paúl corresponden a tumores ginecológicos (18%), seguido de tumores mamarios (13,5%) (Figura 13A), mientras que en la Unidad Oncológica Provincial SOLCA Ibarra los tumores mamarios (36,3%) seguido de los tumores de piel y melanomas (24,4%) (Figura 13B).

De la misma manera en los resultados obtenidos, se evidenció que los casos de cáncer prevalecen en mujeres, es así como muchas mujeres requieren de mayor atención en el área de salud y específicamente en estrategias de prevención y una atención integral para el cáncer de mama principalmente, según los datos de prevalencia y al índice demográfico reportado en la ciudad.

Los datos presentados indican que el cáncer de mama está presente en ambas casas de salud, especialmente en SOLCA. Esta información se puede relacionar con lo descrito por el Global Cancer Observatory, (2020), que en Ecuador en el año 2020 se diagnosticaron 29.273 casos de cáncer tomando en cuenta ambos sexos y todos los grupos etarios en un total de 17.643.060 habitantes, donde se evidenció que el tipo de cáncer con mayor prevalencia fue cáncer de mama con un 12,2%, de la misma manera se puede observar en la presente investigación al cáncer de mama con mayor número de casos reportados en ambas casas de salud.

Por otra parte, la incidencia de cáncer de mama en un periodo de 1 año (2019 al 2020) representó el 11,3% con 67 casos nuevos en el HSVP, mientras que el 2,3% con 5 casos nuevos en SOLCA en la población ibarreña. Así como lo menciona Sung et al., (2021) se conoce que las mayores tasas de incidencia se presentan en países con mayor índice de subdesarrollo humano, donde se evidencia que existen valores superiores a 72,6 casos por 1.000.000 mujeres en Ecuador según datos reportados hasta el año 2020.

Es importante mencionar que los datos de prevalencia resultan útiles en el control de enfermedades de evolución lenta o enfermedades crónicas para planificar servicios sanitarios y estimar necesidades asistenciales. Por tanto, este indicador fue



considerado para el análisis de casos de cáncer ya que permite planificar servicios de salud como diagnóstico y tratamientos. Así también, la incidencia nos indica la probabilidad de que una persona de la población resulte afectada por la enfermedad, de esta manera proponer y evaluar medidas preventivas (Fajardo-Gutiérrez, 2017 ; Tapia Granados, 2005).

Se tomó de referencia al cáncer de mama de ambas casas de salud, tomando en consideración la información reportada en SOLCA al ser aquella institución en la ciudad que cuenta con datos de El Registro Nacional de Tumores que realiza un estudio de cáncer de base poblacional (RCBP). Este registro almacena la información desde 1985 de todos los casos de cáncer diagnosticados en Quito y el resto de ciudades del Ecuador tanto de establecimientos públicos como privados (Caballero, 2021).

Es importante mencionar que los datos de SOLCA a nivel nacional se actualizan en la plataforma web cada 4 años, la publicación más reciente sobre el cáncer en el Ecuador se reportó en el 2019. Se estima que dentro de los próximos 4 años existan cambios en la prevalencia, debido al envejecimiento y crecimiento de la población y factores de riesgo del cáncer (SOLCA, 2019). Para validar esta información, la institución cuenta con un Sistema de Vigilancia en Cáncer donde se recoge información de establecimientos públicos y privados a nivel nacional. La información se reporta cada 2 años en la Asociación Internacional del Registro del Cáncer (IARC) y Global Cancer Observatory (GLOBOCAN) (Campoverde Merchán et al., 2020).

## **4.2 Diseño del anticuerpo monoclonal**

### **4.2.1 Selección de la diana terapéutica**

Se reportaron 38 dianas terapéuticas que se detallan en el siguiente documento: [Dianas terapéuticas en cáncer de mama.xlsx](#) ; las cuales se seleccionaron en base a los parámetros de la sección 3.4.1. Del listado se seleccionaron 10 dianas (*HER2*, *ESR1*, *PGR*, *AKT1*, *BRCA-1*, *BRCA-2*, *FGFR2*, *MTHFR*, *LAMC1*, *FGF3*) que contienen toda la información reportada en las plataformas biológicas, tomando en cuenta los siguientes criterios de selección: expresión en carcinoma de mama, la ubicación subcelular, genes de interacción, fármacos y anticuerpos monoclonales en investigación.

Del listado se seleccionaron cuatro dianas terapéuticas como principales objetivos farmacológicos contra el cáncer de mama en base a la información recopilada, las dianas seleccionadas fueron: *Receptor de estrógeno (ESR1)*, *Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGFR2)*, *Subunidad de laminina gamma-1 (LAMC1)*, *Alfa serina / treonina-proteína quinasa (AKT1)*. Los criterios de selección se muestran en la Tabla 10; la información de vías de señalización y la interacción con otros genes se muestra en los Anexos 5 y 6 respectivamente.

**Tabla 10.** Criterios de selección dianas terapéuticas que intervienen en el cáncer de mama. Tomado de Jassal et al., 2020; Perfetto et al., 2016; Rodchenkov et al., 2020; Stelzer et al., 2016; Mitsopoulos et al., 2021; Wishart et al., 2018.

Criterios	Dianas terapéuticas			
	<i>ESR1</i>	<i>FGFR2</i>	<i>LAMC1</i>	<i>AKT1</i>
<b>Función</b>	Implicado en la unión de la hormona, la unión al ADN y en la activación de la transcripción.	Regulación de la proliferación celular, diferenciación, migración y apoptosis, y en la regulación del desarrollo embrionario.	Procesos biológicos que incluyen la adhesión celular, diferenciación, migración, señalización, crecimiento de neuritas y metástasis.	Fosforila e inactiva los componentes de la maquinaria apoptótica.
<b>Alteración en cáncer</b>	Alterado en el 2,5% de todos los cánceres con carcinoma ductal invasivo de mama, carcinoma de mama invasivo, adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma de pulmón y adenocarcinoma endometrial.	Alterado en el 2,0% de todos los cánceres con adenocarcinoma endometrial, carcinoma ductal invasivo de mama, melanoma cutáneo, adenocarcinoma de colon y adenocarcinoma de pulmón.	N/A	Alterado en el 1,8% de todos los cánceres con carcinoma ductal invasivo de mama, adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma endometrial endometriode, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma de mama invasivo.
<b>Carcinoma de mama</b>	Presente en el 8,3% de las pacientes con carcinoma de mama, según reporte de 8 ensayos clínicos.	Presente en el 2,3% de los pacientes con carcinoma de mama, según reporte de 10 ensayos clínicos.	N/A	Presente en el 4,9% de los pacientes con carcinoma de mama, según reporte de 10 ensayos clínicos.
<b>Ubicación subcelular</b>	Membrana celular	Membrana celular	Membrana celular	Medio intracelular
<b>Vías de señalización</b>	Señalización por <i>ERBB4</i> y la vía de señalización de prolactina.	Fosforilación de <i>PLCG1</i> , <i>FRS2</i> y <i>PAK4</i> .	Interviene en la unión, migración y organización de las células en los tejidos mediante	Fosforilación de <i>PI3K</i> donde <i>AKT</i> regula la proliferación celular, supervivencia,

	Cascada de la quinasa <i>RAF/MAP</i> y la cascada de señalización de <i>PI3K/AKT</i> .	Procesos de ubiquitinación, internalización y degradación.	componentes de la matriz extracelular.	metabolismo y angiogénesis.
<b>Interacción con otros genes</b>	<i>TP53, BRCA1, AKT1, FOXM1</i>	<i>FGFR1, PIK3R1, FGF1, FGF3, FGF8, STAT3, STAT5B</i>	<i>TP53, CHEK1, PTK2</i>	<i>STAT3, MAPK1, MAP3K8, RAC1, PIK3CB</i>
<b>Subunidades de interacción</b>	Se une al ADN como un homodímero. Puede formar un heterodímero con <i>ESR2</i> . Interactúa con <i>SFR1</i> de manera dependiente e independiente del ligando.	Homodímero después de la unión del ligando. Interactúa con <i>FGF1</i> y <i>FGF2</i> . La especificidad del ligando está determinada por la expresión específica de tejido de isoformas, y las diferencias en el tercer dominio similar a Ig.	Consta de tres cadenas polipeptídicas diferentes (alfa, beta, gamma), que están unidas entre sí por enlaces disulfuro en una molécula en forma de cruz que comprende un brazo largo y tres brazos cortos con glóbulos en cada extremo.	Interactúa con <i>MAP3K5</i> y <i>TRAF6</i> . Activa la cascada de señalización <i>PI3K/AKT</i> y <i>AKT1</i> .
<b>Ligabilidad (Puntuación de cáncer)</b>	100%	98%	71%	100%
<b>Objetivo para terapia con anticuerpos</b>	NO	SI	SI	NO
<b>Fármacos aprobados</b>	22 fármacos aprobados (estradiol, tamoxifeno, fulvestrant)	7 fármacos aprobados (Vandetanib, pazopanib, regorafenib, erdafitinib, pemigatinib, infigratinib, nintedanib, palifermin)	Ocriplasmin (Enzima)	4 candidatos clínicos (Uprosertib, Capivasertib, MK-2206, Ipatasertib)
<b>Fármacos para cáncer de mama</b>	3 fármacos aprobados (toremifene, citrato de tamoxifeno, fulvestranto)	7 fármacos en investigación clínica (clorhidrato de pazopanib, erdafitinib, infigratinib, vandetanib, esilo de nintedanib, pemigatinib, regorafenib)	N/A	4 fármacos en investigación clínica (Uprosertib, Capivasertib, MK-2206, Ipatasertib)

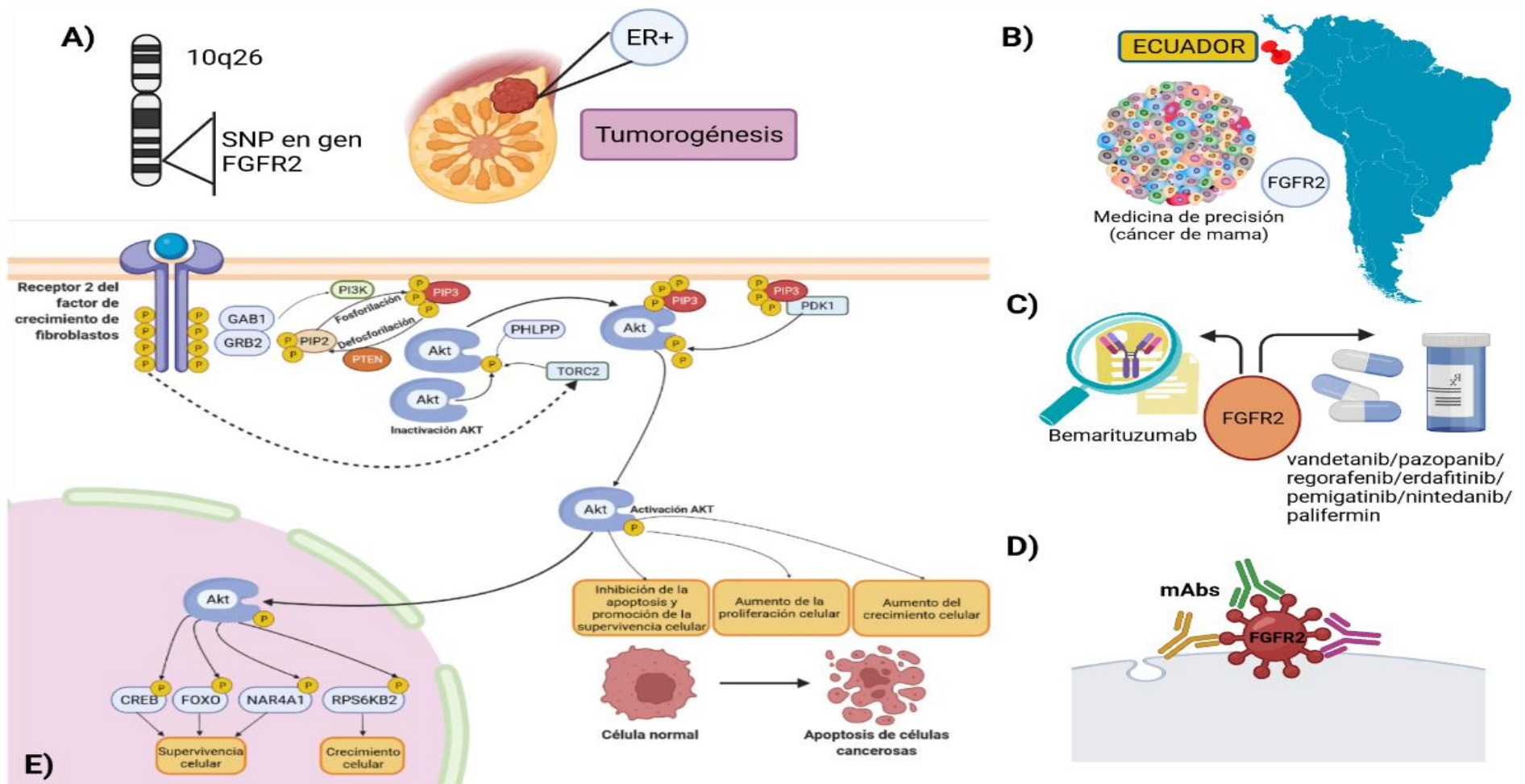
Nota: En base a la información bibliográfica recopilada, se reportó que las dianas terapéuticas *ESR1*, *FGFR2* y *AKT1* fueron investigadas en ensayos experimentales en Ecuador y *LAMC1* en México

El gen *ESR1* es un receptor hormonal nuclear que interviene en el mayor número de alteraciones en carcinoma de mama. Pero al ser un modulador selectivo ya cuenta con fármacos aprobados para esta patología. Además, comprende el mayor puntaje de interacción con cáncer, pero de acuerdo con la información reportada todavía no se considera un candidato adecuado para la terapia con anticuerpos (Thomas y Gustafsson, 2011).

Por otra parte, el gen *FGFR2* juega un papel importante en la proliferación, migración y apoptosis celular por lo que se sobreexpresa en pacientes con carcinoma de mama, además se considera un objetivo adecuado para la terapia contra el cáncer (Turner y Grose, 2010). Así mismo el gen *LAMC1* interviene en proceso de migración y adhesión celular, sin embargo, no existen todavía fármacos aprobados, a pesar de ser un candidato para terapia con anticuerpos (Gaudet et al., 2013).

Por último, el gen *AKT1* está mayormente regulado en procesos de proliferación y angiogénesis, sin embargo, se encuentra en el medio intracelular por lo que presenta mayor complejidad para unirse a un anticuerpo a diferencia de las 3 dianas mencionadas anteriormente que se encuentran anclados a la membrana celular, por lo tanto, esta diana no es considerada un posible objetivo para esta terapia (Coudert et al., 2023).

De acuerdo con la información descrita sobre las posibles dianas terapéuticas, se seleccionó al **factor de crecimiento de fibroblastos 2 - *FGFR2***. En la Figura 16 se presenta un resumen de las características más importantes de la diana terapéutica seleccionada.



**Figura 16.** Características del Receptor *FGFR2*. A) *FGFR2* y cáncer de mama B) Estudio de medicina de precisión - Oncoomics C) Desarrollo de fármacos D) Receptor de superficie celular E) Activación de *PI3K / AKT* y la vía *GPCR*. Adaptado de Kondo et al., 2009; López-Cortés et al., 2020; Stelzer et al., 2016; Manning y Cantley, 2007; Azuma et al., 2011.

En base a la Figura 16 se detallan las principales razones para que *FGFR2* se considere como principal objetivo farmacológico:

**A)** *FGFR2* se sobreexpresa en tumores positivos para receptores de estrógeno (*ER+*) en cáncer de mama, desempeñando un papel primordial en el proceso de tumorigénesis (Meyer et al., 2008). Mediante la *AKT* se induce la amplificación y sobreexpresión génica en el 25 y 30% de pacientes con cáncer de mama. Es así que constituye un objetivo potencial de tratamiento (Kondo et al., 2009; Aboutorabi et al., 2015).

Según Katoh, (2009) el gen en estudio presenta los polimorfismos de nucleótido simple (*SNP*) en el intrón 2 como el rs2981582 que se asocia con un mayor riesgo de cáncer de mama. Seguido de 8 *SNP* (rs35054928, rs2981578, rs2912778, rs2912781, rs35393331, rs10736303, rs7895676 y rs33971856) ubicados en el mismo intrón (Martin et al., 2011).

**B)** Esta diana terapéutica ha sido estudiada en Ecuador evidenciando alteraciones genómicas, vías de señalización y expresión de proteínas en cáncer de mama, y así proponer estudios de medicina de precisión. Por tanto, esta información puede contribuir para realizar futuros estudios experimentales en base a datos clínicos de pacientes con cáncer de mama de la ciudad de Ibarra (López-Cortés et al., 2020).

**C)** Se reportaron 7 fármacos en investigación clínica para bloquear la señalización de *FGFR2*, sin embargo, no existen anticuerpos monoclonales en el mercado contra esta diana terapéutica. Por tanto, 15 empresas biofarmacéuticas todavía se encuentran en investigación clínica sobre posibles anticuerpos monoclonales contra *FGFR2* como el *Bemarituzumab* (Stelzer et al., 2016).

**D)** Se identificó que *FGFR2* se localiza en la membrana celular y se une al ligando en la parte exterior de la célula. Por lo tanto, no necesita cruzar la membrana plasmática en comparación con receptores ubicados en el medio intracelular como *AKT* que necesita ligandos pequeños e hidrofóbicos para atravesar la

membrana y este proceso presenta mayor complejidad al encapsular y transportar la molécula (OpenStx College, 2013).

E) Se determinó que la vía de señalización de *FGFR2*, interviene en la activación de *PI3K / AKT* y la vía *GPCR*, señalizadas por *AKT* que es uno de los resultados clave en la activación del receptor tirosina quinasa (*RTK*). Por lo tanto, *AKT* es activado por el segundo mensajero celular *PIP3*, un fosfolípido generado por *PI3K*. La unión del ligando conduce a la dimerización de *FGFR2*, autofosforilación y activación de componentes de señalización incluyendo *AKT* y *ERK* quinasas. Por otra parte, la fosforilación de serina y treonina activan la *AKT* que juega un papel importante en la supervivencia, crecimiento y metabolismo celular en una célula tumoral (Manning y Cantley, 2007).

#### **4.2.3 Búsqueda de secuencias y estructuras del antígeno y anticuerpo**

Se seleccionó a un anticuerpo monoclonal de referencia PDB:4WV1, para la interacción entre receptor-ligando. El mAb presenta afinidad con receptores *FGF* al ser principales objetivos para terapia contra el cáncer. Además, corresponde a un anticuerpo monoclonal humano (Vofatamab) que interactúa con la diana *FGFR2*, a diferencia de otras estructuras conjugadas que presentaron mayores regiones de unión con otros fármacos y anticuerpos (Yin et al., 2015).

También, se realizó una búsqueda de la región Fc (fragmento cristalizante) de otro anticuerpo monoclonal PDB: 3D6G, para conocer su importancia en la activación del sistema inmunológico. Toda esta información de las regiones y estructuras de las moléculas se detallan en los siguientes apartados.



#### 4.2.4 Secuencia de aminoácidos y regiones de interés de *FGFR2*

Se realizó una búsqueda de la secuencia de la diana terapéutica (*FGFR2*) (Figura 17), tomando en cuenta la Isoforma 1 con 821 aminoácidos y un peso molecular de 92025 Daltons (Chen et al., 2008).

```
1  MVSWGRFICL VVVTMATLSL ARPSFSLVED TTLEPEEPPT KYQISQPEVY
51  VAAPGESLEV RCLLKDAAVI SWTKDGVHLG PNNRTVLIGE YLQIKGATPR
101 DSGLYACTAS RTVDSETWYF MVNVDAISS GDEDDTDGA EDFVSENSNN
151 KRAPYWTNTE KMEKRLHAVP AANTVKFRCP AGGNPMPMTMR WLKNGKEFKQ
201 EHRIGGYKVR NQHWSLIMES VVPSDKGNYT CVVENEYCSI NHTYHLDVVE
251 RSPHRPILQA GLPANASTVV GGDVEFVCKV YSDAQPHIQW IKHVEKNGSK
301 YGPDGLPYLK VLKAAGVNTT DKEIEVLYIR NVT FEDAGEY TCLAGNSIGI
351 SFHSAWLTVL PAPGREKEIT ASPDYLEIAI YCIGVFLIAC MVVTVILCRM
401 KNTTKKPDFS SQPAVHKLTK RIPLRRQVTV SAESSSSMNS NTPLVRRITR
451 LSSTADTPML AGVSEYELPE DPKWEFPRDK LTLGKPLGEG CFGQVMAEA
501 VGIDKDKPKE AVTVAVKMLK DDATEKDLSD LVSEMEMMKM IGKHKNIINL
551 LGACTQDGPL YVIVEYASKG NLREYLRRAR PPGMEYSYDI NRVPEEQMTF
601 KDLVSCITYQL ARGMEYLASQ KCIHRDLAAR NVLVTENNVM KIADFGGLARD
651 INNIDYKKT TNGRLPVKWM APEALFDRVY THQSDVWSFG VLMWEIFTLG
701 GSPYPGIPVE ELFKLLKEGH RMDKPANCTN ELYMMMRDCW HAVPSQRPTF
751 KQLVEDLDRI LTLTTNEEYL DLSQPLEQYS PSYPDTRSSC SSGDSDSVFSP
801 DPMPYEPCLP QYPHINGSVK T
```

**Figura 17.** Secuencia de aminoácidos de la proteína *FGFR2*. Tomado de Katoh, 2011.

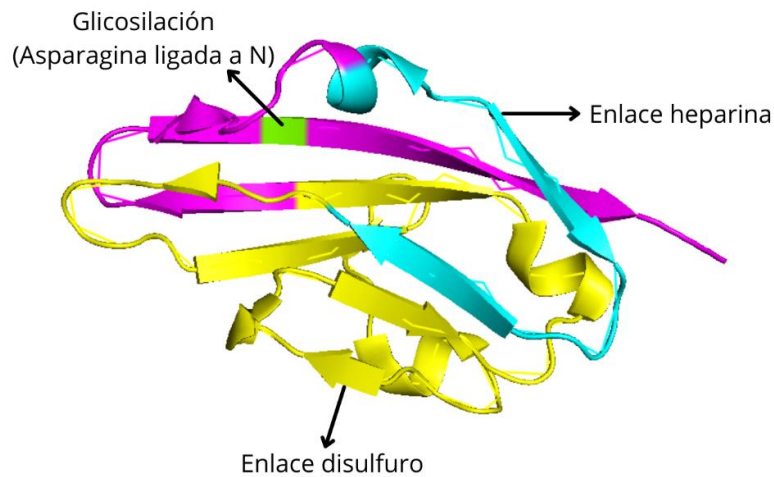
Esta secuencia resulta de gran importancia, para el conocimiento de aquellos aminoácidos que interactúan con el ligando, y de esta manera generar la interacción receptor-ligando. Además, la secuencia peptídica de *FGFR2* es clave para determinar la estructura tridimensional y la función de la proteína. De acuerdo con la búsqueda en la base de datos PDB, se encontraron que los aminoácidos que se unen al anticuerpo monoclonal son del 151 al 246, estas regiones son clave para la interacción entre antígeno-anticuerpo.

Mediante el programa Pymol se visualizó la estructura tridimensional de la secuencia de aminoácidos de *FGFR2* (Figura 18) para reconocer las regiones de interés, las mismas que se detallan en la Tabla 11 donde se muestran los aminoácidos representativos para la unión.

A)

>4WV1\_1|Chains A[auth C], B[auth F]|Fibroblast growth factor receptor  
2|Homo sapiens (9606)  
APYWTNTEKMEKRLHAVPAANTVKFRCPAGGNPMPPTMRWLKNGKEFKQEH  
RIGGYKVRNQHWLIMESVVPDCKGNYTCVVENEYGSINHTYHLDVVER

B)



**Figura 18.** Visualización de la proteína *FGFR2*. A) Secuencia de aminoácidos de la proteína *FGFR2*. Tomado de Berman et al., 2000; B) Estructura de *FGFR2* visualizada en Pymol.

**Tabla 11.** Dominios y regiones de interés de la proteína *FGFR2*. Adaptado de Instituto Europeo de Bioinformática, 2002; Katoh, 2011.

Función	Residuos	Aminoácidos
Enlace disulfuro	179-231	CPAGGNPMPPTMRWLKNGKEFKQEHRIGGYKVRNQHWLIMESVVPDCKGNYTC
Glicosilación	228	Asparagina ligada por N-glicosilación
Dominio i	154 - 247	PYWTNTEKMEKRLHAVPAANTVKFRCPAGGNPMPPTMRWLKNGKEFKQEHRIGGYKVRNQHWLIMESVVPDCKGNYTCVVENEYGSINHTYHLD
Región i	161-178	KMEKRLHAVPAANTVKFR
Estructura secundaria -	152-157 / 166-170 /	-

Hebra Beta	175-178 / 181-185 / 188-193 / 203-205 / 208-210 / 215-218 / 227-235 / 238-249	
Estructura secundaria - Gire	159-162	TEKM
Estructura secundaria - Hélice	200-202 / 211-213 / 223-225	-

En base a la información reportada por Zahn-Zabal et al., (2020;) Chen et al., (2008); Zhang et al., (2006); Gaudet et al., (2013), se detalla a continuación la importancia de las regiones presentadas de *FGFR2* (Tabla 11) para el acoplamiento molecular:

**Enlace disulfuro:** brinda plegamiento y estabilidad a la proteína, especialmente en proteínas secretadas al medio extracelular.

**Glicosilación:** la Asparagina en la posición 228, está ligada por N-glicosilación en en la cadena lateral del aminoácido, siendo el lugar de plegamiento con el ligando para darle función a la proteína.

**Dominio i:** dominio de la proteína de tipo Ig que interactúa directamente con los factores de crecimiento de fibroblastos (*FGF*) y los proteoglicanos de heparán sulfato.

**Región i:** corresponde al sitio de unión a heparina que forma parte del grupo de glucosaminoglicanos.

**Estructuras secundarias:** intervienen en el plegamiento y estabilidad de la proteína, para que pueda interactuar con el ligando y formar una estructura tridimensional.

#### 4.2.5 Secuencia de aminoácidos de la región Fab del anticuerpo monoclonal

Se analizaron las regiones de interés de las secuencias de aminoácidos del fragmento Fab del anticuerpo monoclonal de referencia: cadena pesada (CH) con 230 aminoácidos y cadena ligera (CL) con 214 aminoácidos (Figura 19.A). La estructura de

la región Fab (Figura 19.B) muestra las regiones que permiten la interacción con el receptor (Madej et al., 2014).

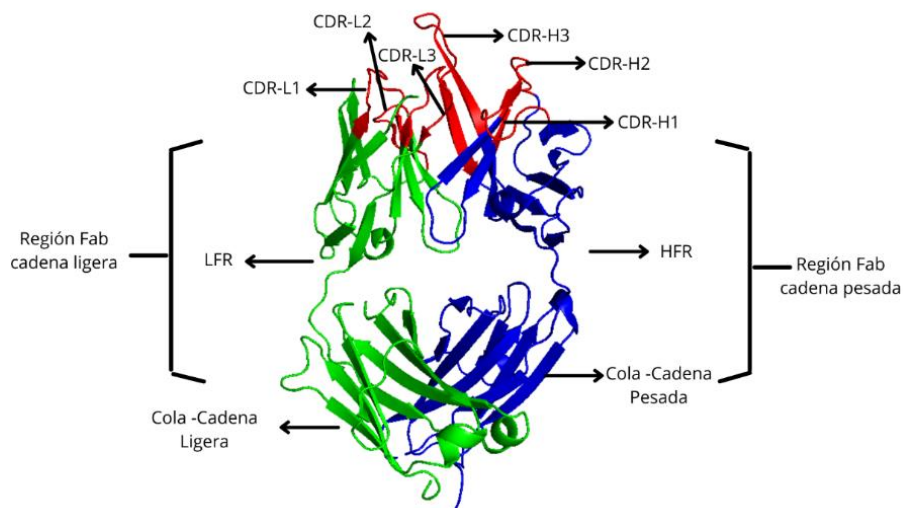
A)

```

>4WV1_2|Chains C[auth B], D[auth E]|Fab heavy chain|Homo sapiens
(9606)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTGISWVRQAPGKGLEWVGR
T
HLGDGSTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARTYGI
Y
DLYVDYTEYVMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
L
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ
T
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
>4WV1_3|Chains E[auth A], F[auth D]|Fab light chain|Homo sapiens
(9606)
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVDTSLAWYKQKPGKAPKLLIYSASF
L
LYSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQSTGHPQTFGQGTKVE
I
IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
N
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
N
NRGEC

```

B)



**Figura 19.** Estructura de la región Fab del anticuerpo monoclonal. A) Secuencia de aminoácidos de la región Fab. Tomado de Berman et al., 2000; B) Visualización de las regiones Fab de cadena pesada y ligera en Pymol.

En base a la información reportada por Swindells et al., (2017); Yin et al., (2015); Yuan et al., (2017), se detallan las regiones que permiten la interacción con el receptor (Figura 19.B):

**Región determinante de complementariedad (CDR):** es el sitio de unión al antígeno, en la que se reportó que intervienen los aminoácidos de las 3 regiones de cadena pesada: CDR-H1 = Ser 31 - Ser35; CDR-H2 = Arg50 - Gly 66; CDR-H3 =

Thr99 - Tyr116 y las 3 regiones de cadena ligera: CDR-L1 = Arg24 - Ala34; CDR-L2 = Ser50 - Ser56; CDR-L3 = Glt89 – Thr97.

A su vez, los CDRs comprenden las siguientes subregiones que forman parte de la estructura del mAb:

**Las regiones macro:** de las cadenas pesadas y ligeras (HFR-LFR) son secuencias conservadas que ayudan a los CDR a interactuar con el receptor.

**La cola:** La cadena pesada y ligera forman la cola del anticuerpo, donde se puede interactuar con receptores de Fc en diversas células.

**Tabla 12.** Región Fab cadena pesada del anticuerpo monoclonal. Tomado de Craic Computing, 2010.

Región	Fragmento de secuencia	Residuos	Largo
HFR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFT	1 - 30	30
CDR-H1	STGIS	31 - 35	5
HFR2	WVRQAPGKGGLEWVG	36 - 49	14
CDR-H2	RTHLGDGSTNYADSVKG	50 - 66	17
HFR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	67 - 98	32
CDR-H3	TYGIYDLYVDYTEYVMDY	99 - 116	18
HFR4	WGQGTLVTVSS	117 - 127	11
Cola	ASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT	127 - 230	103
	VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS		
	GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK		
	VEPKSC		
<b>Total</b>			<b>230</b>

**Tabla 13.** Región Fab cadena ligera del anticuerpo monoclonal. Tomado de Craic Computing, 2010.

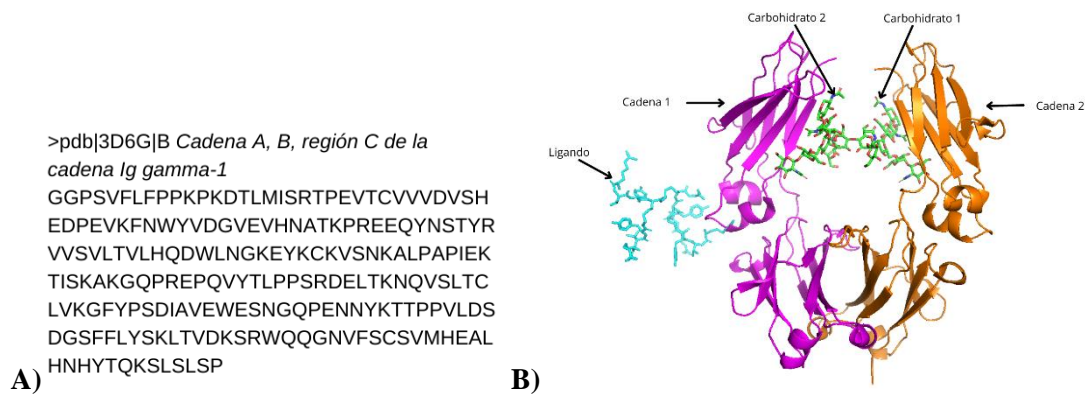
Región	Fragmento de secuencia	Residuos	Largo
LFR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	1 - 23	23
CDR-L1	RASQDVDTSLA	24 - 34	11
LFR2	WYKQKPGKAPKLLIY	35 - 49	15

CDR-L2	SASFLYS	50 - 56	7
LFR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	57 - 88	32
CDR-L3	QQSTGHPQT	89 - 97	9
LFR4	FGQGTKVEIKRTV	98 - 110	13
Cola	AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ	110 - 214	104
	WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD		
	STYLSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC		
<b>Total</b>			214

La estructura de las regiones Fab son clave para determinar el sitio de anclaje y ligamiento con el antígeno, específicamente las secuencia de los CDR que lo complementan y por lo tanto le dan a este receptor su especificidad (Carrasco-Yalán, 2021). Así como lo menciona Yin et al., (2015) el anticuerpo seleccionado se puede modificar a través de visualización de fagos guiados por su estructura para generar una mejor afinidad con *FGFR2* al ser uno de los objetivos candidatos para la terapia del cáncer.

#### 4.2.6 Secuencia de aminoácidos de la región Fc de otro anticuerpo monoclonal

Se realizó una búsqueda de la secuencia de 210 aminoácidos del anticuerpo monoclonal PDB: 3D6G, para conocer la interacción y la unión con otros fármacos en la región Fc. Se identificaron las áreas del fragmento Fc (Figura 20) conformadas por las cadenas 1 y 2, un ligando de proteína A y carbohidratos: n-acetil-d-glucosamina, beta-d-manosa, alfa-d-manosa, alfa-l-fucosa y 2-[[[(2s)-2,6-bis[[[(2s)-2,6-bis[[[(2r)-2-[[[(2r,3r)-2-[[[(2r)-2- ácido amino-5 carbamimidamido-pentanoil]amino]-3-hidroxi-butanoil]amino]-3-(4 hidroxifenil)propanoil]amino]hexanoil]amino]hexanoil]amino]etanoico (Madej et al., 2014).



**Figura 20** Estructura de la región Fc del anticuerpo monoclonal. A) Secuencia de aminoácidos de la región Fc; B) Visualización de las regiones Fc en Pymol. Tomado de Berman et al., 2000.

La región bisagra del fragmento Fc es un sitio de unión a proteínas importante y bien caracterizado, conocido por interactuar con varias proteínas naturales y ligandos sintéticos (Burley et al., 2021). Las regiones de interés de Fc del mAb en estudio, muestran los puntos clave de anclaje, unión e interacciones con fármacos y otras moléculas como la presencia de una interacción específica entre los aminoácidos proteicos Val308, Leu309, e His310 del dominio C $\gamma$ 2 y el terminal Arg del brazo del dendrímero (Moiani et al., 2009).

El presente estudio se puede correlacionar con la información reportada por Kang & Jung, (2019) donde estableció que para la unión de fármacos se pueden acoplar ciertos aminoácidos en la región Fc. En su investigación, demostraron que los alotipos de *Fc $\gamma$ R1IIa* en la posición 158 pueden poseer un residuo de valina (V) o fenilalanina (F). La isoforma con V en la posición 158 tiene alta afinidad por el dominio Fc de *IgG1*, mientras que el alotipo F en la posición 158 tiene baja afinidad. También, sugiere que se puede sustituir una asparagina en el residuo en la posición 297 con otros residuos 89–92 y también la incorporación de mutaciones de aminoácidos en residuos responsables de la unión *Fc $\gamma$ Rs* o *CIq93*.

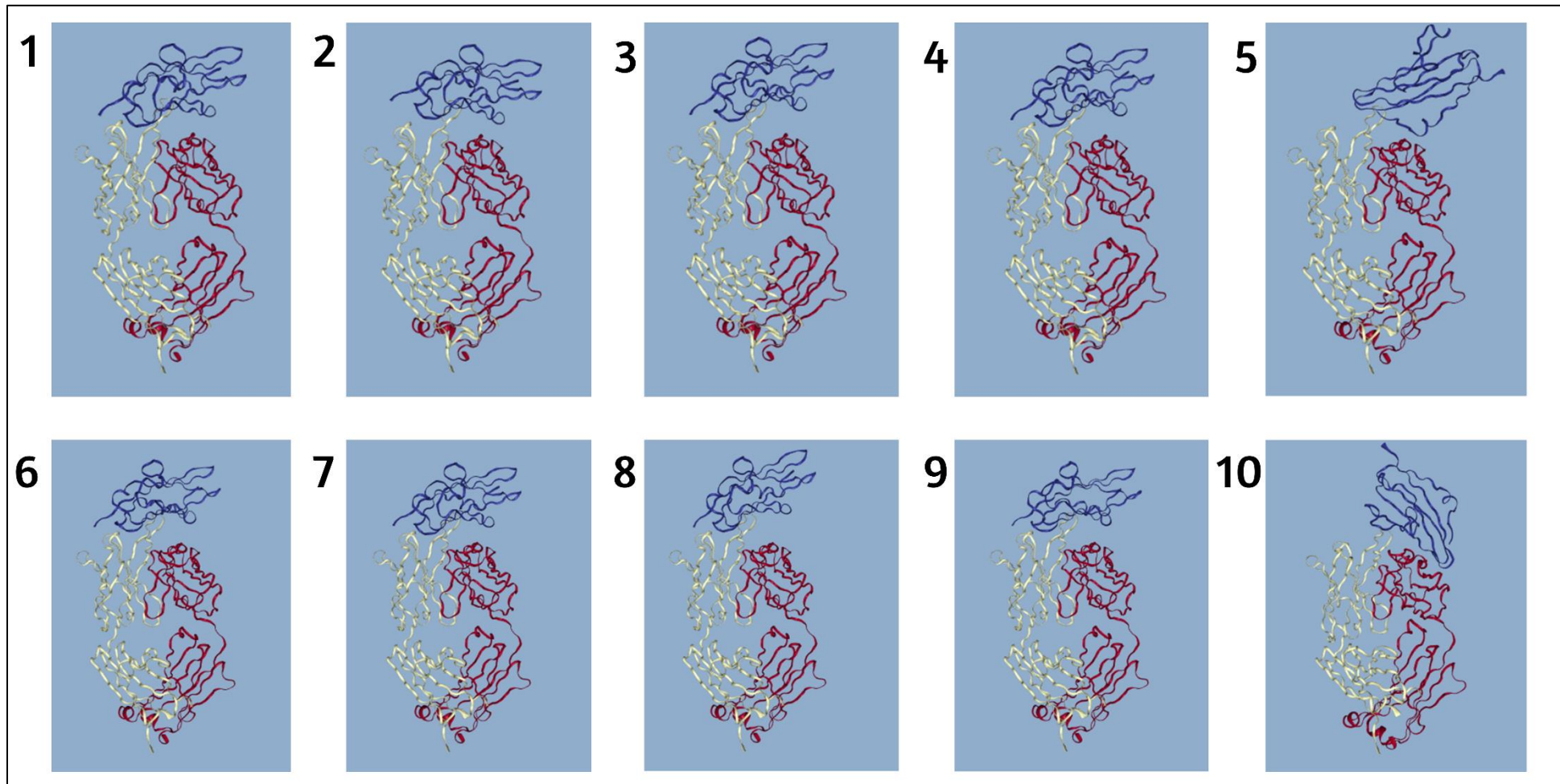
Con la información reportada anteriormente, se considera que las secuencias proteicas son importantes para comprender estructuralmente los sitios de unión entre la region Fab del anticuerpo monoclonal y la proteína *FGFR2*. Además, la modificación postraduccional que sufre la proteína en la región Asp 228 resulta ser el punto de anclaje para la unión con otras moléculas como el anticuerpo monoclonal.

Así como lo menciona Simpson y Caballero, (2014), se puede identificar mutaciones frecuentes que conllevan a sustituciones de aminoácidos en los CDR de la región Fab del mAb para mejorar su función farmacológica en la interacción antígeno-anticuerpo. De esta manera establecer y desarrollar alternativas de diseño de fármacos mediante ensayos *in silico* para el cáncer de mama.

#### **4.2.7 Acoplamiento molecular**

Se obtuvieron diez modelos estructurales de acoplamiento entre receptor-ligando en Pydock Web, basados en niveles de energía y las mejores poses conformacionales entre las moléculas como se muestra en la Figura 21.





**Figura 21.** Top 10 de predicciones estructurales de acoplamiento generadas por PyDock.

La Figura 21, indica los mejores modelos de interacción entre proteína-proteína en base a los ángulos de rotación para cada uno de los modelos generados mediante el método de difracción de rayos X (Cheng et al., 2007). Los modelos 5, 6, 9 y 10 varían la conformación estructural en cuanto a la unión entre ligando-receptor, donde la proteína *FGFR2* cambia su disposición espacial lo que condiciona su capacidad de interacción con la región Fab del anticuerpo. Mientras que los modelos 1, 2, 3, 4 y 8 presentan una conformación similar en cuanto a la orientación espacial del receptor.

En la Tabla 14 se muestran los diez mejores resultados detectados por el programa de un total de 1000 conformaciones en base a la interacción de las moléculas y tipos de energía de cuerpo rígido, para cada uno de los modelos estructurales de la Figura 21.

**Tabla 14.** Resultados acoplamiento de los modelos predichos en base a la interacción de energía en Pydock Web.

<b>Modelos estructurales</b>	<b>Conformación</b>	<b>Electrostática</b>	<b>Desolvatación</b>	<b>Van der Waals</b>	<b>Total</b>
1	49	-42,745	-5,025	1,982	-47,571
2	7909	-37,431	-9,315	12,994	-45,446
3	1690	-32,822	-6,806	-28,984	-42,526
4	927	-36,818	-6,898	31,741	-40,541
5	614	-28,077	-16,051	65,556	-37,572
6	1263	-31,959	-7,915	41,522	-35,722
7	90	-39,639	-4,671	91,254	-35,184
8	1692	-26,165	-9,431	6,494	-34,946
9	742	-37,491	-7,079	101,779	-34,393
10	9092	-31,31	1,489	-31,024	-32,924

Según Jiménez-García et al., (2013), para definir el mejor modelo de acoplamiento, se toma en cuenta los tres parámetros (electrostática, desolvatación y van der waals) que aportan al valor total, en base a un valor de energía menor a -1kc/mol como mejor modelo conformacional.

Por tanto, se seleccionaron los modelos 1,2,3 y 4 por su menor nivel de energía, sin embargo, el modelo 1 (Figura 20;1) de la conformación 49 corresponde a mejor

modelo posible, donde la interacción entre las moléculas representa un movimiento térmico que hace que la energía disminuya, con un valor total de -47,571 y genere una mejor interacción entre receptor-ligando. A diferencia de los otros modelos que pueden afectar su afinidad, ya que no se forma un complejo estable para la interacción entre las moléculas y así lograr predecir posibles candidatos a fármacos.

#### 4.2.8 Análisis de Especificidad

Mediante el programa Tabs se identificó que el anticuerpo monoclonal PDB: 4WV1 es un anticuerpo humano obtenido de la técnica de pantalla de fagos de anticuerpos. La Tabla 15 muestra el porcentaje de afinidad del antígeno con el anticuerpo en base a las cadenas pesadas y ligeras, las regiones del anticuerpo y el número de aminoácidos.

**Tabla 15.** Descripción de las regiones del mAb. Tomado de Craic Computing, 2010

Cadenas del mAb	Regiones
gamma1 cadena pesada (1-457)	[VH (Homo sapiens IGHV3- 66*01 (85,7%) – (IGHD) – IGHJ4*01 (100%)) [8.8.20] (1-127) – Homo sapiens IGHG1*03v, G1m3>G1m17, nG1m1 (CH1 R120>K (224) (128-225), bisagra (226-240), CH2 (241-350), CH3 E12 (366), M14 (368) (351-455), CHS (456-457)) (128-457)], (230-214') – disulfuro
cadena ligera kappa (1'- 214')	[V-KAPPA (Homo sapiens IGKV1-5*01 (86,7%) – IGKJ1*01 (100%)) [6.3.9] (1'-107') – Homo sapiens IGKC*01, Km3 A45,1 (153), V101 (191) (108'-214'); dímero (236-236":239-239") – bisdisulfuro

En base a los resultados obtenidos, el anticuerpo monoclonal está diseñado con genes humanos que codifican para la creación de un polipéptido que formará parte de una de las dos cadenas pesadas y ligeras, dentro de la estructura de las inmunoglobulinas (Craic Computing, 2010). Por tanto, el porcentaje de interacción (100%) representa el nivel de especificidad del anticuerpo unido a una proteína humana, capaz de interactuar contra sus epítomos para generar la acción farmacológica y así contribuir en el desarrollo de fármacos (Simpson y Caballero, 2014).

Mediante el programa web BLASTp se encontraron similitudes de interacción entre el mAb con estructuras de origen humano, y se realizó una comparación con la interacción entre el antígeno (*FGFR2*) y el anticuerpo monoclonal (Rédei, 2008). En la Figura 22 se muestra el porcentaje de identidad (100%) en 10 secuencias de la base de datos que tienen mayor parecido a la secuencia del anticuerpo monoclonal.

Secuencias que producen alineaciones significativas									
<input checked="" type="checkbox"/> seleccionar todo 10 secuencias seleccionadas <span style="float: right;"> <a href="#">Descargar</a> <a href="#">Seleccionar columnas</a> <span>Show 10</span> </span>									
<a href="#">GenPept</a> <a href="#">Gráficos</a> <a href="#">Distancia árbol de resultados</a> <a href="#">Alineación múltiple</a> <a href="#">Visor de MSA</a>									
	Descripción	Nombre científico	Maximo puntaje	Puntaje total	Cubierta de consulta	valor E	Por. Identificador	Cuenta Len	Adhesión
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Estructura cristalina del dominio FGFR2 D2 en complejo con Fab 2B.1.3 [Homo sapiens]</a>	<a href="#">Homo sapiens</a>	211	211	100%	6e-69	100,00%	99	<a href="#">4WV1_C</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Estructura cristalina de FGF1 complejo con el ectodominio de FGFR2b que alberga la mutación P253...</a>	<a href="#">Homo sapiens</a>	214	214	100%	3e-68	100,00%	231	<a href="#">3QJM_B</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Cadena E. RECEPTOR 2 DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS [Homo sapiens]</a>	<a href="#">Homo sapiens</a>	213	213	100%	6e-68	100,00%	220	<a href="#">1IIL_E</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">ESTRUCTURA CRISTALINA DE UN COMPLEJO TERNARIO FGF1-FGFR2-HEPARINA [Homo sapiens]</a>	<a href="#">Homo sapiens</a>	213	213	100%	6e-68	100,00%	219	<a href="#">1E0O_B</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Cadena E. PROTEÍNA (RECEPTOR 2 DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS) [Homo...</a>	<a href="#">Homo sapiens</a>	213	213	100%	7e-68	100,00%	220	<a href="#">1EV2_E</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Cadena P. receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos [Homo sapiens]</a>	<a href="#">Homo sapiens</a>	213	213	100%	7e-68	100,00%	220	<a href="#">2FDB_P</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Estructura cristalina de baja resolución del complejo FGFR2D2D3/FGF1/SR128545 [Homo sapiens]</a>	<a href="#">Homo sapiens</a>	213	213	100%	7e-68	100,00%	223	<a href="#">4J23_A</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos [Homo sapiens]</a>	<a href="#">Homo sapiens</a>	214	214	100%	8e-68	100,00%	251	<a href="#">KAI2557496.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">FGFR4 variante soluble 4 [Homo sapiens]</a>	<a href="#">Homo sapiens</a>	214	214	100%	1e-67	100,00%	281	<a href="#">ACF47637.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/>	<a href="#">Chain A. Fibroblast growth factor receptor 2 [Homo sapiens]</a>	<a href="#">Homo sapiens</a>	207	207	97%	1e-67	100,00%	104	<a href="#">1WVZ_A</a>

**Figura 22.** Resultado BLASTp de similitud de secuencias con el mAb. Tomado de BLAST, 2021.

El anticuerpo monoclonal de referencia al ser un anticuerpo humano, es capaz de interactuar con proteínas de origen humano, por tanto no existe una respuesta a la reacción, lo que permite realizar las funciones efectores para acoplarse con la proteína y así aumentar la especificidad dirigida contra un solo blanco terapéutico (Langjahr y Sotelo, 2016).

### 4.3 Bioproceso para la producción del anticuerpo monoclonal

Se tomaron en cuenta los siguientes parámetros en base a información bibliográfica para definir el esquema del proceso de producción del anticuerpo monoclonal:

#### 4.3.1 Sistemas de expresión

Se realizó una comparación entre las enzimas *GS* (*Glutamina Sintetasa*) y *DHFR* (*dihidrofolato reductasa*) al poseer promotores fuertes para impulsar la expresión de los genes de anticuerpos y así determinar aquella que proporciona mayor nivel de expresión vectorial.

El vector de expresión *pEE14* contiene a la enzima *GS*, que porta el gen de interés y la codifica como minigen (Knox et al., 2013). Esta enzima es usada como sistema de expresión en células de ovario de hámster chino para producción de 10g/L de producto de anticuerpos monoclonales (Knox et al., 2013; Nakamura y Omasa, 2015). Mientras que el vector *pSV-b-Gal* contiene a la enzima *DHFR* como marcador selectivo y con el gen b-galactosidasa como gen reportero (Lin et al., 2009).

Se reportaron que el desarrollo de estos genes de interés se realiza mediante la inserción en el genoma de la célula huésped a través de la integración específica del sitio o la integración aleatoria mediante la amplificación de los genes de *dhfr* y *gs* (Fischer et al., 2015).

Según Kingston et al., (2002) el sistema *DHFR* es más utilizado ya que brinda altos niveles de amplificación (hasta 1000 copias por célula en algunos casos) y expresión de las proteínas de interés, a comparación con el sistema *GS* que requiere de mayor número de copias para alcanzar máximos niveles de expresión. Así también, las células CHO tienen mayor afinidad con *DHFR* al ser un marcador selectivo a diferencia de *GS* donde la producción es inestable al utilizar el proceso de amplificación vectorial (Birch y Racher, 2006).

### 4.3.2 Parámetros de upstream

#### 4.3.2.1 Línea Celular

Se realizó una comparación de las líneas celulares empleadas para el desarrollo de biofármacos tomando en cuenta sus principales ventajas y desventajas para la producción de proteínas terapéuticas.

La línea celular de *Escherichia coli* tiene un crecimiento rápido y fácil manipulación genética, sin embargo, es incapaz de realizar modificaciones posttransduccionales (glicosilación) (Walsh, 2016). Las levaduras brindan un crecimiento rápido y también tienen facilidad de manipulación genética, pero el patrón de glicosilación varía un poco del patrón observado en la glicoproteína nativa (Strohl, 2012).

Los hongos se expresan en proteínas de alto nivel, muchas de las cuales se secretan en el medio extracelular, pero ningún biofarmacéutico producido por tales medios ha buscado o ganado hasta ahora aprobación de comercialización (Walsh, 2016). Por último, las células de mamífero son capaces de realizar modificaciones posttransduccionales del producto proteico, a pesar de los complejos requerimientos nutricionales (Hong et al., 2018). Actualmente los sistemas de producción más empleados en la industria son las células de mamíferos en la producción de biofarmacéuticos que han sido aprobados hasta el año 2017 (Walsh, 2014).

Con la información reportada anteriormente, se realizó una comparación entre células de ovario de hámster chino (CHO) y células de mieloma de ratón (NSO) al emplearse en la producción de anticuerpos monoclonales como se indica en la Tabla 16.

**Tabla 16.** Comparación entre células CHO y NSO para la producción de anticuerpos monoclonales

Células de ovario de hámster chino (CHO)	Células de mieloma de ratón (NSO)	Referencias
--	-----------------------------------	-------------

<b>Función</b>	Eficientes en la realización de modificaciones posttransduccionales.	Células auxótrofas de colesterol.	Orellana et al., 2015 ; Li et al., 2010
<b>Sistemas de expresión</b>	Producen anticuerpos recombinantes que utilizan sistemas de expresión <i>DHFR</i> y <i>GS</i> .	El genotipo de las células utiliza el sistema de expresión <i>GS</i> .	Birch y Racher, 2006
<b>Densidad celular</b>	$3 \times 10^6$ células/ml después de 4 días.	Densidad celular inicial de $2,5 \times 10^5$ células/ml hasta un máximo de $3 \times 10^6$ células/ml después de 3-4 días.	Villacrés et al., 2021
<b>Rendimiento</b>	10 g / L	80-100mg/L	Hong et al., 2018 ; Robinson et al., 1994
<b>Glicosilación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Anticuerpos producidos en células CHO tienen estructuras batenarias con N-acetilglucosamina (bisección <i>GlcNAc</i>) y altos niveles de fucosilación del núcleo.</li> <li>•Índice de galactosilación (IG) de <math>0,58 \pm 0,05</math>, que corresponde a una distribución de glicanos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Presenta N-glicanos que son estructuras batenarias del tipo complejo con fucosilación del núcleo y sin bisección de residuos de <i>GlcNAc</i>.</li> <li>•Índice de galactosilación (IG) de <math>0,68 \pm 0,03</math>, que corresponde a una distribución de glicanos.</li> </ul>	Li et al., 2010 ; Villacrés et al., 2021
<b>Tasa de crecimiento</b>	Es de $0,03$ a $0,05 \times h^{-1}$ (tiempo de duplicación, 14-23h) de la tasa de crecimiento microbiano.	Tasa de crecimiento de $0,02 \times h^{-1}$ durante primeras 48 h.	Omasa et al., 2010; Villacrés et al., 2021

Se identificó que las células CHO tienen un crecimiento celular de  $3 \times 10^6$  células/ml y un rendimiento de 10g/L a comparación de las células NSO, seguido de modificaciones posttransduccionales como ventaja en el proceso de glicosilación.

Según Lin et al., (2019) las células CHO tienen mayor adaptabilidad a la suspensión, a un sistema de cultivo en medio libre de suero bovino, rápida proliferación, facilidad de manipulación genética y el perfil de glicosilación. También brindan mayor facilidad para obtener la aprobación de la FDA para comercializar proteínas terapéuticas, ya que presenta amplios sistemas de amplificación de genes como *DHFR* y *GS* y pueden adaptarse rápidamente al crecimiento en biorreactores (Kim et al., 2012).

Además, el costo de producción de las células CHO es de \$ 300/ g de producto y pueden secretar proteínas recombinantes en un medio en suspensión con más del 15% de las proteínas sobrenadantes como el producto objetivo a comparación del resto de líneas celulares (Omasa et al., 2010).

#### 4.3.2.2 Tipo de biorreactor

Se describieron dos tipos de biorreactores que se emplean con mayor frecuencia para la producción de biofármacos como son los siguientes:

**Biorreactor de tanque agitado:** presenta una adecuada capacidad de transferencia de oxígeno, mezclado eficiente, control efectivo de la temperatura (37° C), mantenimiento de la esterilidad y 80% de humedad en la producción de células productoras de anticuerpos monoclonales (Maschke et al., 2022). Según el estudio de Steinebach et al., (2017) se puede producir 2,13 mg/ml de anticuerpo monoclonal (*Alematuzumab*) con una densidad inicial de  $4 \times 10^6$  células/ml y final de  $2,15 \times 10^7$  células/ml en un volumen de trabajo de hasta 2000L en un biorreactor comercial Allegro™ STR con un título de producto de 5g/L.

**Biorreactor de perfusión:** controla la presión como parámetro principal, además del abastecimiento suficiente de las células con oxígeno y nutrientes, sin embargo, presenta una gran desventaja en el proceso de esterilización del biorreactor (Fan et al., 2018). A diferencia del biorreactor de tanque agitado, los valores de producto de anticuerpos monoclonales disminuyen, ya que se logra producir 0,5g/L por



día y un título de producto de 1,9 g/L en un volumen de trabajo de hasta 6L (Pörtner, 2020).

Según Kim et al., (2012) en base a la información reportada se tomó como referencia al biorreactor de tanque agitado, ya que las células CHO se pueden adaptar fácilmente al crecimiento en condiciones de suspensión sin suero. Se considera una característica preferida para el cultivo a gran escala en biorreactores. Se puede escalar a volúmenes superiores a 10.000 L, así obtener un mayor crecimiento y viabilidad celular y calidad.

#### *4.3.2.3 Modo de operación*

Se estableció que el cultivo tipo Feed Batch (semialimentado) es el más adecuado, debido a que en pequeños volúmenes los nutrientes se alimentan al cultivo durante el proceso de fermentación para mantener la suficiente cantidad de nutrientes, además el cultivo es cosechado al final del ciclo (Birch y Racher, 2006).

Este proceso de cultivo se considera una de las estrategias de alimentación más eficaces, que ha contribuido a mejorar el crecimiento y la productividad de anticuerpos monoclonales en los últimos años. Este medio de cultivo proporciona las siguientes características para producción de mAbs:

- Se puede lograr un rendimiento de 10g/L de anticuerpos monoclonales, mientras que en proceso continuo se alcanza 0,1 -1g/L (Flaherty et al., 2020).
- Producción anual de 200Kg/año, a diferencia del proceso continuo con 28kg/año (Tihanyi y Nyitray, 2020).
- El proceso feedbatch presenta mayores densidades celulares y por lo tanto el producto puede alcanzar mayores rendimientos en comparación con el proceso por lotes debido a la extensión del tiempo de producción (Guzman y Feuerstein, 2013).

#### *4.3.2.4 Medio de cultivo*

En base a la información reportada por Li et al., (2010), se consideraron a las células CHO como el huésped predominante utilizado para producir proteínas

terapéuticas. Por lo tanto, se estableció el medio de cultivo en base a la línea celular CHO DG44 debido a su capacidad para producir de 2 a 4 pg/células/día, que esta optimizado para el crecimiento de células CHO deficientes en *DHFR* y la expresión de proteínas recombinantes.

De acuerdo a la información reportada por Thermo Fisher Scientific, (2020), el medio de cultivo GIBCO® CD DG44 (Tabla 17), es un medio sin proteínas, definido químicamente y diseñado para permitir el crecimiento y expresión óptima de células DG44 en cultivos en suspensión. En el Anexo 7 se muestra el proceso de elaboración del medio de cultivo GIBCO® CD DG44 el cual puede ser escalable y emplearse en otros contenedores.

**Tabla 17.** Especificaciones del medio de cultivo GIBCO CD DG44. Tomado de Thermo Fisher Scientific, 2020

<b>Parámetros</b>	<b>Criterios</b>
Especies	Hámster
Clasificación	Sin origen animal, químicamente definido, sin proteínas, sin suero
No. de celdas	$1 \times 10^7$
Tampón de bicarbonato de sodio	Bicarbonato de sodio
Elemento o gen establemente integrado	dhfr-
Suplementos	Timidina, hipoxantina
Línea de producto	Gibco™
Glutamina	Sin glutamina
Indicador rojo de fenol	Sin rojo fenol
Con aditivos	Piruvato de sodio
Tipo de cultivo	Cultivo de células en suspensión

### 4.3.3 Parámetros de downstream

Se reportó que para la preparación de un extracto se determina el amortiguador con sales químicas y pH definido mediante propiedades bioquímica. Posteriormente se define el método para separación de la proteína de interés (Carreto et al., 2021). A continuación, se detallan los principales métodos empleados para purificación de Mabs más utilizados en la industria biofarmacéutica:

**Cromatografía de exclusión de tamaño:** permite intercambiar anticuerpos en tampones particulares y eliminar componentes no deseados de bajo peso molecular. Así también, las membranas de diálisis, resinas de exclusión de tamaño y los dispositivos de diafiltración se emplean para separar inmunoglobulinas (Harkins, 2000).

**Separación mediante gel de electroforesis:** se realiza en geles de agarosa de poliacrilamida, que permiten que las proteínas de menor tamaño como los mAbs se desplacen con más rapidez que las proteínas más grandes (Flatman et al., 2007).

**Columnas de desalinización:** los mAbs pasan por un intercambio de amortiguación para hacerlos adecuados para su posterior utilización. Es método permite una recuperación del producto del 95%, por tanto, es más rápido y presenta un menor riesgo de pérdida de muestras (Marissen, 2014).

**Cromatografía por afinidad:** es un método específico para proteínas que interactúan con otras moléculas como ligando, en donde una proteína del extracto se une a un ligando inmovilizado en la columna, mediante el paso de volúmenes de la fase móvil (Carreto et al., 2021).

En base a la información reportada, se estableció a la cromatografía de afinidad como método de separación, al ser un proceso rápido y eficiente para purificar anticuerpos monoclonales de su medio de cultivo, mediante el uso de proteína A (Bendezú et al., 2019). Según Ramos-de-la-Peña et al., (2019), la cromatografía de afinidad de proteína A es un proceso bien conocido en la industria farmacéutica debido a su alta afinidad y los niveles de pureza que se pueden obtener con ella.

De manera interesante, la cromatografía de afinidad de proteína A es altamente selectiva hacia mAbs, resultando una pureza >90% en el primer paso, y su alta

selectividad en la interacción de la región Fc del anticuerpo con la Proteína-A inmovilizada (Figura 22). Los anticuerpos unidos a las columnas de afinidad de la proteína A se pueden eludir a pH bajo, preferiblemente entre pH 3 y pH 4. (Chahar et al., 2020b)

Por otra parte, mediante un sistema que emplea biorreactores a microescala (15 ml) se puede determinar un proceso que permita detectar múltiples condiciones de este en paralelo. Por lo tanto, los tampones y la resina (proteína A) dependen del anticuerpo específico purificado y el proceso se detalla en el Anexo 8.

#### **4.3.4 Análisis de heterogeneidad del producto**

Se consideró a la glicosilación como la principal modificación en una proteína que afecta su eficacia y vida media *in vivo*. Por lo tanto, se establecieron las siguientes características de glicosilación: metabolismo, fuente de carbono disponible, temperatura, pH y oxígeno disuelto, tomando en cuenta la disponibilidad y actividad de las enzimas (Papathanasiou y Kontoravdi, 2020). Una vez concentrado el producto, se pueden determinar los perfiles de glicanos mediante espectrometría de masas como se describe en el Anexo 9.

#### **4.3.5 Patentes**

Para validar el proceso de patentabilidad, la FDA menciona que se debe establecer evidencia documentada de que un proceso producirá un producto que cumpla con especificaciones y atributos de calidad. El proceso debe estar completamente caracterizado y validado para comprender el impacto de las entradas del proceso (parámetros operativos) en los resultados del proceso (indicadores de rendimiento y atributos de calidad). Por último, las especificaciones de calidad del producto se establecen y aprueban como parte de la solicitud de licencia biológica (BLA) (Li et al., 2010).

De acuerdo con la información reportada por la FDA, se reportó que el costo para patentar anticuerpos monoclonales es de \$ 1.4 mil millones a \$ 2.6 mil millones de

dólares. Así la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos examinará y aprobará dicha patente para un periodo de 15 a 20 años (Cockburn y Long, 2015). Los altos costos pueden verse reflejados en tres factores principales: insumos para la investigación, los ensayos en animales y humanos y las tasas de fracaso en los candidatos preclínicos (Danzon, 2012).

Según el Servicio Nacional de Derechos Intelectuales, (2010) en Ecuador para realizar el trámite de patentabilidad de un biofármaco el costo es de \$208,00 aproximadamente y se debe regir a la RESOLUCIÓN No. 10-04 Instructivo IEPI (Tabla 18) para la concesión de licencias obligatorias sobre patentes de fármacos, en donde establece las normas que regirán el procedimiento a aplicarse en la tramitación de las peticiones que se formulen para obtener las respectivas licencias.

**Tabla 18.** Instructivo para la concesión de licencias obligatorias sobre patentes de fármacos en Ecuador. Adaptado de Servicio Nacional de Derechos Intelectuales, 2010.

Artículo	Procedimiento
3	Presentar la petición de concesión de licencia obligatoria
4	La DNPI revisara la documentación, tomando en cuenta que las licencias obligatorias sobre patentes de fármacos podrán concederse para el uso público no comercial o para uso comercial.
5	Licencia obligatoria para uso público no comercial: presentar el RUC, RUP, declaración juramentada y propuesta del precio.
6	Licencia obligatoria para uso comercial: presentar declaración juramentada, autorización del titular de los derechos y propuesta del precio.
7	La DNPI notificara al titular de la patente sobre la licencia obligatoria presentada
8	La DNPI enviara una Petición al Ministerio de Salud Pública para determinar si el producto es de uso humano para el tratamiento enfermedades.
9	La DNPI analizará la documentación para conceder o denegar la licencia obligatoria
10	La compensación económica, al pago de una remuneración adecuada que el solicitante de la licencia obligatoria reconocerá al titular de la patente
11	La concesión de licencias obligatorias no menoscabará el derecho del titular de seguir explotando la patente.
12	Nadie distinto a los titulares de las patentes y de las licencias obligatorias podrá explotar una patente y los infractores serán castigados en conformidad con la Ley.

- 13 La impugnación de la licencia obligatoria no impedirá la explotación ni ejercerá ninguna influencia en la compensación económica.
- 14 La DNPI podrá revocar la licencia obligatoria cuando las circunstancias que dieron origen a la licencia hayan desaparecido.
- 15 La licencia obligatoria podrá ser modificada si así lo solicita el titular de la patente.

### 4.3.6 Estimación económica

En base a los 246 casos diagnosticados con cáncer de mama en la ciudad de Ibarra en el periodo 2019-2020, se estableció un presupuesto en base a los equipos principales y los servicios, las especificaciones preliminares, lista de motores y consumos eléctricos para producir anticuerpos monoclonales. La información es basada en referencias bibliográficas (Anexo 10) sobre valores estimados para el costo de inversión y producción de la planta como se detalla en los siguientes apartados.

#### 4.3.6.1 Costos de inversión

Para determinar los costos de los equipos se establecieron valores referenciales de empresas que ofertan equipos e insumos de laboratorio (Anexo 11) tomando en cuenta las especificaciones y volúmenes a emplear para la producción de anticuerpos monoclonales.

Con el método de Lang se estimó el capital fijo total tomando como referencia el coste de compra del equipo principal (EPC), en el que se incluye biorreactores y demás insumos, también se tomó en cuenta el costo de instalación, terreno y demás instrumentación que necesitaría la planta de producción como se muestra en la Tabla 19.

**Tabla 19.** Costo de inversión de la planta según método de Lang

Ítem	Factor multiplicador	Costo (\$)
Costo de compra del equipo (EPC)	$1,00 \times \text{EPC}$	180687,12
Instalación	$0,3 \times \text{EPC}$	54206,14
Tubería	$0,5 \times \text{EPC}$	90343,56

Instrumentación	0,30 × EPC	54206,14
Obras de construcción	0,30 × EPC	54206,14
Mejora del patio	0,10 × EPC	18068,71
Compra de terrenos	Precio asumido	25000,00
Tasas, licencias	0,04 × EPC	7227,48
Planificación	0,25 × EPC	45171,78
Gestión del sitio	0,05 × EPC	9034,36
Arranque	0,07 × EPC	12648,10
Contingencias	0,40 × EPC	72274,85
Capital de explotación	0,30 × EPC	54206,14
<b>Capital fijo total</b>		<b>677.280,50</b>

#### 4.3.6.2 Costos de producción

Se determinaron los reactivos que se emplearán en un proceso de producción (Anexo 11) tomando como referencia el precio unitario, la cantidad y el costo total por producto. Se estableció como base la producción de 1,3kg considerando que el 70% corresponde al producto y 30% a las pérdidas (Anexo 12), de acuerdo con la cantidad requerida para el número de pacientes diagnosticados con cáncer que necesitan tal producto en la ciudad de Ibarra.

En base a la información referencial del anticuerpo monoclonal comercial Trastuzumab (*Herceptin*) empleado como tratamiento para el cáncer de mama, se determinaron el número de dosis para producir 1,3 kg de producto. Así como menciona McKeage y Perry, (2002), se recomienda una dosis del biofarmaco de 4 mg/kg de peso por personas cada 3 semanas. Por lo tanto, con 1,3kg de producto se obtendría 250.000 para aproximadamente 250 personas diagnosticadas con cáncer en la ciudad de Ibarra.

Según Aboutorabi et al., (2015) el biofármaco trastuzumab tomado como referencia presenta un alto costo de tratamiento en comparación con otros agentes quimioterapéuticos. Una caja de 440mg de Trastuzumab puede llegar a costar \$57.188 y un ciclo completo puede llegar a los \$70.000 aproximadamente. Por tanto, los mejores resultados de salud deben justificar los costos del biofármaco. Es importante tomar en cuenta su proceso de producción la compensación entre costo y beneficio que es un criterio clave para el respectivo reembolso (Treish et al., 2001).

La Tabla 20 muestra el costo de producción de la planta con un valor estimado de \$62.784,43 tomando de referencia la materia prima directa (Anexo 13), materia prima indirecta y mano de obra en base a 1,3kg de producto y 250kg estimados para producción anual. De esta manera determinar el costo unitario (1kg) de producto que corresponde a un valor de \$251,14.

Es importante mencionar que el tiempo de respuesta de proveedores y aprobación de solicitudes de proformas de empresas internacionales puede interferir en los costos de inversión y producción de anticuerpos monoclonales, sin embargo, fue posible estimar los costos más comunes que se analizan en una planta de producción de mAbs.

**Tabla 20.** Costo de producción de la planta para producir anticuerpos monoclonales

<b>Rubro</b>	<b>Unidad</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Costo unitario (\$)</b>	<b>Costo total (\$)</b>	<b>Costo anual (\$)</b>
				<b>1,3kg</b>	<b>250kg</b>
<b>MATERIA PRIMA</b>					
<b>DIRECTA</b>					
Dihidrofolato					
reductasa ( <i>DHFR</i> Antibody (5B2))	uL	10	1,25	12,50	2.403,85
ProCHOTM 5 Protein-free CHO Medium	mL	12	0,14	1,73	333,18
Solución roja de l-glutamina y fenol 50×.	mL	150	0,38	57,00	10.961,54
Solución HT de 50×.	mL	450	0,05	24,03	4.621,15
Solución de azul tripano (0,4%).	mL	2	0,40	0,80	153,85
Trastuzumab (Herceptin)	mg	4	4,15	16,59	3.190,95
Thermo Scientific™ Tris	gr	5	0,15	0,73	141,19
Invitrogen™ NaCl (5 M)	mL	10	0,36	3,60	692,31
Fosfato de sodio Thermo Scientific™	gr	5	0,08	0,41	79,00



Dimethylformamide (DMF)	mL	12	1,40	16,80	3.230,77
Tampón de elución de IgG Pierce™, pH 2,0	mL	10	0,10	1,04	200,29
CD DG44 Medium	mL	100	0,15	14,80	2.846,15
CHO DG44 Cells (Cgmp Banked)	cells/mL	50	1,32	66,04	12.699,56
PLURONIC F-68	mL	10	0,61	6,05	1.163,46
L-Glutamine 200mM	mL	10	2,81	28,15	5.412,50
<b>Subtotal Materia prima directa</b>					<b>48.129,76</b>
<b>MATERIA PRIMA INDIRECTA</b>					
<b>Suministros de limpieza y esterilización</b>					
Herramientas de conexión de equipos		8	285,00		2.280,00
<b>Subtotal Materia prima indirecta</b>					<b>3.530,00</b>
<b>MANO DE OBRA</b>					
Operarios de planta		3	454,89		1.364,67
Ingenieros		5	1500,00		7.500,00
<b>Subtotal Mano de Obra</b>					<b>8.864,67</b>
<b>COSTOS INDIRECTOS DE FABRICACIÓN</b>					
Agua		1	60,00		60,00
Luz		1	80,00		80,00
Vapor		1	70,00		70,00
Mantenimiento		1	50,00		50,00
Equipos de protección personal		10	200,00		2.000,00
<b>Subtotal CIF</b>					<b>2.260,00</b>

#### 4.3.6.3 Parámetros de producción

La Tabla 21 muestra las características del proceso de cultivo para la producción de 250kg anuales de anticuerpos monoclonales en base a información bibliográfica de parámetros del proceso de producción en 4 biorreactores, haciendo referencia a las pérdidas y ganancias del producto.

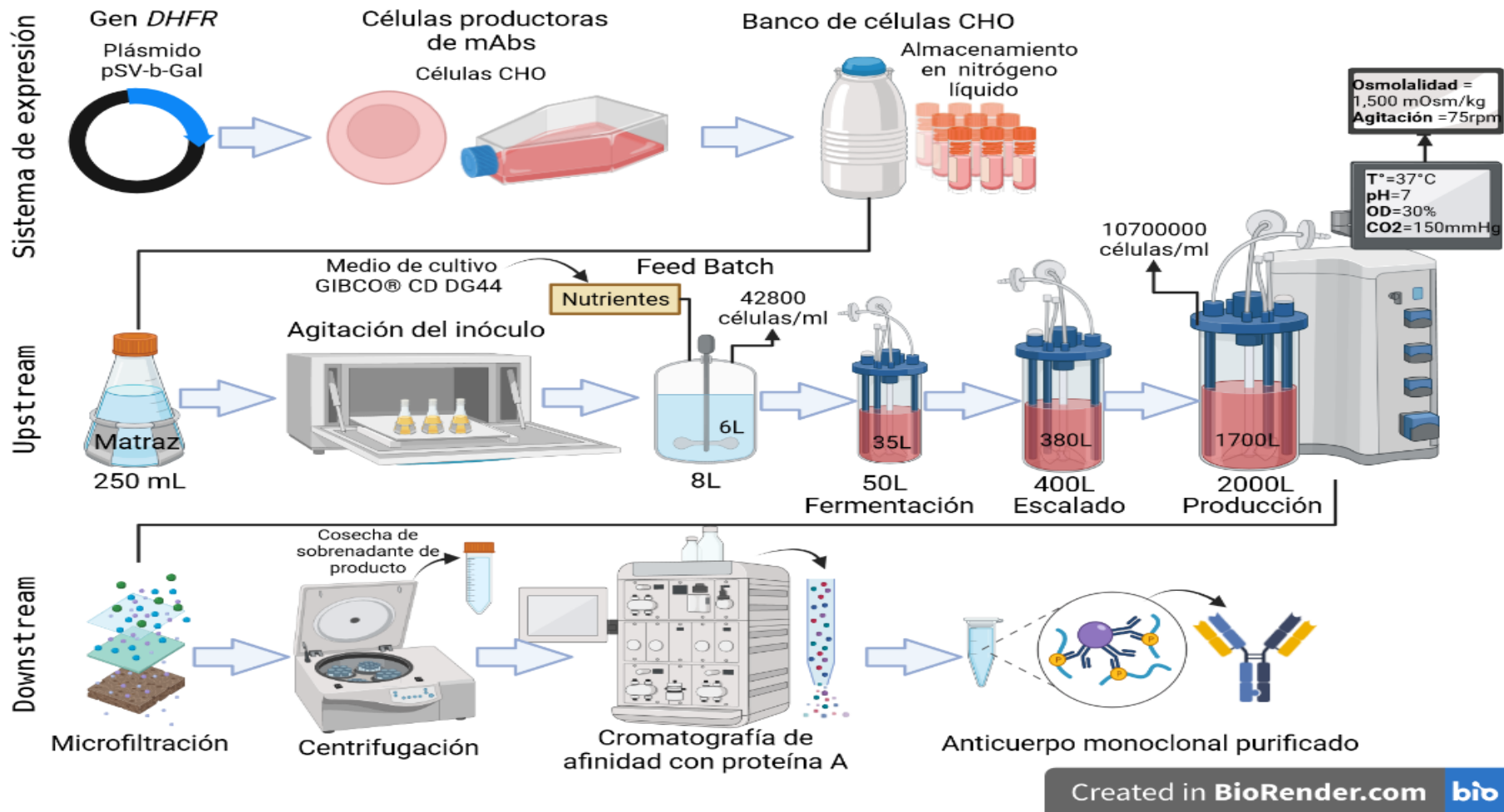
**Tabla 21.** Parámetros de producción estimados para 250kg de producto anual. Adaptado de Han et al., 2016; Colin y BjØrn, 2006.

Medio de cultivo	Químico
Tipo de fermentador	Feed-batch
Volumen del fermentador	v = 2000L
Tipo de agua	Corriente
Producción del fermentador principal 4	250 kg/a
Perdidas de producto	30%
Volumen útil del fermentador	70%
Tiempo de operación	t = 14 d
Concentración final de células	$X_f = 10,7 \times 10^6$ células/ml
Inóculo inicial	$X_o = 17,3 \times 10^6$ (6) células/ ml
Rendimiento global	Y = 0,8 g/g
Tasa de producción específica	$q_p = 0,81 \times 10^{-9}$ mg/células*h
Tiempo de turno	t_t = 8h/d

Según (Gottschalk, 2009) es posible que aumente la productividad debido a los títulos de cultivo y densidad celular que permitirán mejorar las fases de producción, considerándose títulos de hasta 10g/L. Por lo tanto, las altas densidades celulares dan lugar a volúmenes de lotes muy grandes (por ejemplo, un título de 10 g/L) en un biorreactor de 25.000L generaría 250 kg de material de cosecha y 200kg en un lote de sustancia farmacéutica.

En la Figura 23 se indica un panorama general del bioproceso de producción de anticuerpos desde sistemas de expresión hasta la purificación del producto en base a la

información reportada en las secciones anteriores, este esquema puede servir como línea base para investigaciones experimentales.



**Figura 23.** Panorama general de un bioproceso para la producción de anticuerpos monoclonales. Adaptado de Ramos-de-la-Peña et al., 2019; Omasa et al., 2010; Birch y Racher, 2006; Fisher et al., 2019.

#### 4.3.6.4 Proyección para la producción de anticuerpos monoclonales

Se realizó una proyección para la producción de anticuerpos monoclonales en un periodo de 5 años (Tabla 22), estimando un aumento de 50kg de producción anual en base al valor de la inflación (2,56%) para el año 2022. Por lo tanto, se esperaría invertir \$138.929,34 en producción de 277,86 kg de producto de anticuerpos monoclonales como un biofármaco para el año 2027.

**Tabla 22.** Proyección de producción en un periodo estimado de 5 años

Descripción	2023	2024	2025	2026	2027
Biofármaco (producción potencial)	300	350	400	450	500
Costo Unitario	251,14	257,57	264,16	270,92	277,86
<b>Total (\$)</b>	75.341,31	90.148,39	105.664,22	121.915,37	138.929,34

Se reportó de forma referencial el costo de ensayos clínicos con anticuerpos monoclonales en base a estimación de costos en Investigación y Desarrollo (I+D) con un valor aproximado de \$4.500 millones de dólares en las fases de descubrimiento, preclínica y clínica del biofármaco, específicamente para el área de oncología existe un costo aproximado de \$944 a \$2.100 millones de dólares (Schlander et al., 2021).

Según Hollevoet y Declerck, (2017) para el costo de desarrollo de anticuerpos monoclonales se toma en cuenta su tamaño y su complejidad en el proceso de purificación, los cuales pueden variar entre \$50 a \$100 por gramo de mAb. Además, se conoce que para la fase preclínica se requiere \$60 millones de dólares en el que interviene la preparación y desarrollo de procesos, seguido de la fase clínica tomando de referencia lo siguiente:

- Fase I: \$1,5 millones de dólares para analizar la seguridad del producto en humanos.
- Fase II: \$10 millones de dólares para realizar una evaluación inicial de eficacia.
- Fase III: \$12 millones de dólares para evaluar de forma definitiva la eficacia y probar las dosis en gran número de pacientes.

Por último, se reportó que para la fase preclínica se puede iniciar con un proceso de fabricación de 500L y un título de 2,5g/L, mientras que en la Fase I y II se puede

llegar a 2000L y un título de 2,5 g/L, seguido de la Fase III con 6000L y un título de 5g/L aproximadamente según el número de pacientes (Farid et al., 2020).

Se considera que la fase preclínica es la que representa un costo elevado debido al proceso de obtención del fármaco, ya que el costo de purificación representa la mayor parte de la producción. Esto depende del uso de resina de proteína A que se emplea generalmente para mínimo 200 ciclos, también del volumen y la demanda de producto. Con estos parámetros el costo por gramo aumenta de la misma manera que aumenta la inversión inicial (Gottschalk, 2009).

Según Lu et al., (2020) el mercado de los anticuerpos se valoró en aproximadamente \$150 mil millones para fines del 2019 y se estima \$300 mil millones para el año 2025 con estudios clínicos para más de 570 anticuerpos monoclonales terapéuticos y con más de 80 mAbs (32 para el cáncer) aprobados por la FDA de los Estados Unidos para uso clínico. Tales datos se han basado en reportes de compañías biológicas y farmacológicas donde se han aprobado nuevos medicamentos para tratar diversas enfermedades humanas, incluidos muchos tipos de cáncer, enfermedades autoinmunes, metabólicas e infecciosas.

Por tanto, los mAbs están en constante evolución debido al uso de nuevas tecnologías en cuanto a las técnicas de hibridoma, visualización de fagos, ratones transgénicos, anticuerpos conjugados, producción, purificación y estrategias para su administración (Si et al., 2021). Además, la incorporación de inmunoterapias contra el cáncer debe regularse de acuerdo con los beneficios clínicos para los pacientes del sistema de salud pública como en el HSVP y además analizar la carga financiera que su prescripción impondría al presupuesto del Ministerio de Salud Pública.

## CAPÍTULO V

### 5.CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 Conclusiones

- Los tipos de cáncer con mayor prevalencia en el HSVP corresponden a tumores ginecológicos (18%), seguido de tumores mamarios (13,5%). En SOLCA fueron los tumores mamarios (36,3%) seguido de los tumores de piel y melanomas (24,4%). El cáncer de mama, de forma general, es el de mayor prevalencia en pacientes de la ciudad de Ibarra en el periodo 2019-2020.
- Se determinó que en SOLCA se emplean terapias combinatorias entre fármacos químicos y anticuerpos monoclonales (*trastuzumab* y *bevacizumab*) para tratar el cáncer de mama, así como también para el cáncer de piel y de ovario.
- Se reportó que el *Factor de Crecimiento de Fibroblastos 2 (FGFR2)* es la diana terapéutica que se sobreexpresa en pacientes con carcinoma de mama, se ancla en la membrana celular para la interacción con un ligando, no existen biofármacos en el mercado y es un objetivo farmacológico adecuado para la terapia con mAbs.
- Se evidenció que la región de la proteína *FGFR2*, específicamente el aminoácido Asp 228 puede interactuar con los CDRs del anticuerpo monoclonal PDB:4WV1. Mediante Pydock Web se obtuvieron 10 modelos estructurales de acoplamiento entre ligando-receptor, con predicciones de energía que permiten el estudio de candidatos a fármacos.
- Para futuras investigaciones se determinó que las células CHO mediante un biorreactor de tanque agitado, tipo feed batch pueden tener un rendimiento de 10g/L de producto, por lo tanto, son adecuadas para la expresión y producción de proteínas recombinantes.
- Para un aproximado de 250 pacientes diagnosticados con cáncer en la ciudad de Ibarra, se estimó en base a 1,3kg de producto, un total de 250.000 dosis del biofarmaco, para ser administrado cada 3 semanas.

## 5.2 Recomendaciones

- La firma de un convenio entre la Universidad Técnica del Norte y SOLCA Quito y Guayaquil sería de mucha utilidad e importancia para obtener y analizar datos estadísticos más reales de prevalencias e incidencias de cáncer por provincias del Ecuador.
- Se recomienda aplicar este estudio teórico en la Universidad Técnica del Norte en las nuevas áreas de Biotecnología Humana y Cultivo celular como referencia para ensayos experimentales en el desarrollo de proteínas terapéuticas.
- Para una futura investigación se recomienda aplicar programas de simulación como BioProfile FLEX para el control del proceso de producción de proteínas terapéuticas y así tener un panorama real de producción.



## REFERENCIAS

- Aboutorabi, A., Hadian, M., Ghaderi, H., Salehi, M., & Ghiasipour, M. (2015). Cost-effectiveness analysis of trastuzumab in the adjuvant treatment for early breast cancer. *Global Journal of Health Science*, 7(1), 98–106. <https://doi.org/10.5539/gjhs.v7n1p98>
- Alvarez-Gomez, R. M., De la Fuente-Hernandez, M. A., Herrera-Montalvo, L., & Hidalgo-Miranda, A. (2021). Challenges of diagnostic genomics in Latin America. *Current Opinion in Genetics and Development*, 66, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2020.12.010>
- Alves, C. S., & Dobrowsky, T. M. (2017). *Heterologous Protein Production in CHO Cells*. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1603). <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-6972-2>
- Azuma, K., Tsurutani, J., Sakai, K., Kaneda, H., Fujisaka, Y., Takeda, M., Watatani, M., Arao, T., Satoh, T., Okamoto, I., Kurata, T., Nishio, K., & Nakagawa, K. (2011). Switching addictions between HER2 and FGFR2 in HER2-positive breast tumor cells: FGFR2 as a potential target for salvage after lapatinib failure. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 407(1), 219–224. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.03.002>
- Badr, S., Okamura, K., Takahashi, N., Ubbenjans, V., Shirahata, H., & Sugiyama, H. (2021). Integrated design of biopharmaceutical manufacturing processes: Operation modes and process configurations for monoclonal antibody production. *Computers and Chemical Engineering*, 153, 14. <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2021.107422>
- Bansal, P., & Balas, V. E. (2020). *Proceedings of International Conference on Artificial Intelligence and Applications* (Springer N). ICAIA 2020 Organizing Committee.
- Barrezueta, H. del P. (2020). *Resolución-ARCSA-DE-016-2020-LDCL-NTS-para-autorizar-la-importación-por-excepción-e-importación-por-donación-de-medicamentos-productos-biológicos-y-dispositivos-médicos..pdf*.
- Baxevanis, C. N., Perez, S. A., & Papamichail, M. (2009). Combinatorial treatments including vaccines, chemotherapy and monoclonal antibodies for cancer therapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 58(3), 317–324. <https://doi.org/10.1007/s00262-008-0576-4>
- Bendezú, J., Choque, R., Fernández, M., Marzal, M., Morales, S., Montesinos, R., Paredes, A., & Rojas, A. (2019). Manual de laboratorio para cultivo de hibridomas. Obtención y purificación de anticuerpos monoclonales. In *Manual de laboratorio para cultivo de hibridomas. Obtención y purificación de anticuerpos monoclonales*. <https://doi.org/10.19083/978-612-318-241-0>
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., & Bourne, P. E. (2000a). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235–242. <https://doi.org/10.1093/NAR/28.1.235>
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., & Bourne, P. E. (2000b). The Protein Data Bank. In *Nucleic*

- Acids Research* (Vol. 28, Issue 1, pp. 235–242). Oxford Academic. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Bhambure, R., Kumar, K., & Rathore, A. S. (2011). High-throughput process development for biopharmaceutical drug substances. *Trends in Biotechnology*, 29(3), 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.12.001>
- Birch, J. R., & Racher, A. J. (2006). Antibody production. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(5–6), 671–685. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.12.006>
- BLAST. (2021). *Herramienta básica de búsqueda de alineación local*. National Center for Biotechnology Information. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Breedveld, F. C. (2000). Therapeutic monoclonal antibodies. *The Lancet*, 355, 6.
- Burley, S. K., Bhikadiya, C., Bi, C., Bittrich, S., Chen, L., Crichton, G. V., Christie, C. H., Dalenberg, K., Di Costanzo, L., Duarte, J. M., Dutta, S., Feng, Z., Ganesan, S., Goodsell, D. S., Ghosh, S., Green, R. K., Guranovic, V., Guzenko, D., Hudson, B. P., ... Zhuravleva, M. (2021). RCSB Protein Data Bank: Powerful new tools for exploring 3D structures of biological macromolecules for basic and applied research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology, bioengineering and energy sciences. *Nucleic Acids Research*, 49(1), D437–D451. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1038>
- Caballero, H. (2021). *Boletín Epidemiológico 2021* (Vol. 03). <http://solcaquito.org.ec/images/rntLibros/boletin3mama.pdf>
- Cacciatore, J. J., Chasin, L. A., & Leonard, E. F. (2010). Gene amplification and vector engineering to achieve rapid and high-level therapeutic protein production using the Dhfr-based CHO cell selection system. *Biotechnology Advances*, 28(6), 673–681. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.04.003>
- Campoverde Merchán, F., Campoverde Arévalo, N., & García Matamoros, E. K. (2020). La tasa de Mortalidad General del Ecuador del INEC subestima erróneamente al Cáncer. *Oncología (Ecuador)*, 30(3), 178–191. <https://doi.org/10.33821/488>
- Carrasco-Yalán, A. (2021). Anticuerpos monoclonales: desarrollo físico y perspectivas terapéuticas. *Diagnóstico*, 60(4), 204–212. <https://doi.org/10.33734/diagnostico.v60i4.323>
- Carreto, S. R., Zaragoza, B. M., & Almazan, C. R. (2021). Purificación de proteínas. *Mensaje Bioquímico*, 45, 35–47.
- Carvajal, B., Carrillo, H., Ysmael-Acle Sánchez, G., Román, M., José, J., semestral, P., Mata, M., Mora, R., & Mora Román, K. (2019). Anticuerpos Monoclonales Biespecíficos: Desarrollo, Producción Y Anticancerígena. *Revista Médica De La Universidad De Costa Rica*, 506, 19.

- Cazap, E., Buzaid, A., Garbino, C., de la Garza, J., Orlandi, F., Schwartzmann, G., Vallejos, C., Guercovich, A., & Breitbart, G. (2010). Breast cancer in Latin America: Experts perceptions compared with medical care standards. *Breast*, *19*(1), 50–54. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2009.10.011>
- Cazar, A. R., & Urquizo, M. C. (2017). Política pública y acceso a medicamentos químicos y biológicos Política pública y acceso a medicamentos químicos y biológicos. In *Medicamentos Biológicos* (p. 116). Litocolor.
- Chahar, D. S., Ravindran, S., & Pisal, S. S. (2020a). Monoclonal antibody purification and its progression to commercial scale. *Biologicals*, *63*(August), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2019.09.007>
- Chahar, D. S., Ravindran, S., & Pisal, S. S. (2020b). Monoclonal antibody purification and its progression to commercial scale. *Biologicals*, *63*(April), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2019.09.007>
- Chen, H., Xua, C. F., Ma, J., Eliseenkova, A. V., Li, W., Pollock, P. M., Pitteloud, N., Miller, W. T., Neubert, T. A., & Mohammadi, M. (2008). A crystallographic snapshot of tyrosine trans-phosphorylation in action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(50), 19660–19665. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807752105>
- Chen, Z. (2019). Prospects of immunotherapy for cancer. *Frontiers of Medicine*, *13*(1). <https://doi.org/10.1007/s11684-019-0691-y>
- Cheng, T. M.-K., Blundell, T. L., & Fernandez-Recio, J. (2007). pyDock: Electrostatics and Desolvation for Effective Scoring of Rigid-Body Protein–Protein Docking. *InterScience, BIO2004-05879*, 13. <https://doi.org/10.1002/prot21419>
- Chu, D. T., Bac, N. D., Nguyen, K. H., Tien, N. L. B., Thanh, V. Van, Nga, V. T., Ngoc, V. T. N., Dao, D. T. A., Hoan, L. N., Hung, N. P., Thu, N. T. T., Pham, V. H., Vu, L. N., Pham, T. A. V., & Raj, D. B. T. G. (2019). An update on anti-CD137 antibodies in immunotherapies for cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(8), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms20081822>
- Cockburn, I., & Long, G. (2015). The importance of patents to innovation: Updated cross-industry comparisons with biopharmaceuticals. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, *25*(7), 739–742. <https://doi.org/10.1517/13543776.2015.1040762>
- Colin, R., & BjØrn, K. (2006). Basic biotechnology: Third edition. In *Basic Biotechnology: Third Edition* (Cambridge). <https://doi.org/10.1017/CBO9780511802409>
- Comité de Comercio del Senado EE.UU. (2022). *Terapia dirigida para el cáncer*. National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/targeted-therapies>
- Coudert, E., Gehant, S., de Castro, E., Pozzato, M., Baratin, D., Neto, T., Sigrist, C. J. A., Redaschi, N., & Bridge, A. (2023). Annotation of biologically relevant ligands in UniProtKB using ChEBI. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *39*(1). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac793>

- Craic Computing. (2010). *Tabs - Bases de datos de anticuerpos terapeuticos*. Vofatamab -. <https://tabs.craic.com/>
- Danzon, P. M. (2012). The Economics of the Biopharmaceutical Industry. In *The Oxford Handbook of Health Economics* (Issue December 2018). <https://doi.org/10.1093/oxfordhb/9780199238828.013.0022>
- Dicato, M. A., & Cutsem, E. Van. (2013). *Side Effects of Medical Cancer Therapy* (Second Edi). Springer International Publishing AG. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-70253-7>
- Doran, M. P. (2013). Bioprocess Engineering Principles Second Edition. In *Academic Press* (Elsevier).
- Ecker, D. M., Jones, S. D., Levine, H. L., Ecker, D. M., Jones, S. D., & Levine, H. L. (2015). The therapeutic monoclonal antibody market The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs*, *0862*, *7*. <https://doi.org/10.4161/19420862.2015.989042>
- Fajardo-Gutiérrez, A. (2017). Medición en epidemiología: prevalencia, incidencia, riesgo, medidas de impacto. (Measurement in epidemiology: prevalence, incidence, risk, impact measures). *Revista Alergia México*, *64*(1), 109–120.
- Fan, Y., Ley, D., & Andersen, M. R. (2018). Fed-batch CHO cell culture for lab-scale antibody production. *Methods in Molecular Biology*, *1674*, 147–161. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7312-5\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7312-5_12)
- Farid, S. S. (2007). Process economics of industrial monoclonal antibody manufacture. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *848*(1), 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.07.037>
- Farid, S. S., Baron, M., Stamatis, C., Nie, W., & Coffman, J. (2020). Benchmarking biopharmaceutical process development and manufacturing cost contributions to R&D. *MAbs*, *12*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1080/19420862.2020.1754999>
- Fischer, S., Handrick, R., & Otte, K. (2015). The art of CHO cell engineering: A comprehensive retrospect and future perspectives. In *Biotechnology Advances* (Vol. 33, Issue 8). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.10.015>
- Fisher, A. C., Kamga, M. H., Agarabi, C., Brorson, K., Lee, S. L., & Yoon, S. (2019). The Current Scientific and Regulatory Landscape in Advancing Integrated Continuous Biopharmaceutical Manufacturing. *Trends in Biotechnology*, *37*(3), 253–267. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.08.008>
- Flatman, S., Alam, I., Gerard, J., & Mussa, N. (2007). Process analytics for purification of monoclonal antibodies. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *848*(1), 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.11.018>
- García Merino, A. (2011). Anticuerpos monoclonales. Aspectos básicos. *Neurología*, *26*(5), 301–306. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2010.10.005>
- García Ramos, S. E., García Poza, P., & Ramos Díaz, F. (2011). Utilización terapéutica de los anticuerpos monoclonales. *Ars Pharmaceutica*, *52*(3), 46–57.
- Gaudet, P., Argoud-Puy, G., Cusin, I., Duek, P., Evalet, O., Gateau, A., Gleizes, A.,

- Pereira, M., Zahn-Zabal, M., Zwahlen, C., Bairoch, A., & Lane, L. (2013). NeXtProt: Organizing protein knowledge in the context of human proteome projects. *Journal of Proteome Research*, 12(1), 293–298. <https://doi.org/10.1021/PR300830V>
- Gaughan, C. L. (2016). The present state of the art in expression, production and characterization of monoclonal antibodies. *Molecular Diversity*, 20(1), 255–270. <https://doi.org/10.1007/s11030-015-9625-z>
- Ghaderi, F., Ahmadvand, S., Ramezani, A., Montazer, M., & Ghaderi, A. (2018). Production and characterization of monoclonal antibody against a triple negative breast cancer cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 505(1), 181–186. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.09.087>
- Global Cancer Observatory. (2020). Ecuador fact sheets cancers. *International Agency for Research on Cancer*, 563, 1–2. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/218-ecuador-fact-sheets.pdf>
- Gottschalk, U. (2009). *Purification scale purification of antibodies* (WILEY). [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1294-1\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1294-1_13)
- Grilo, A. L., & Mantalaris, A. (2019). The Increasingly Human and Profitable Monoclonal Antibody Market. *Trends in Biotechnology*, 37(1), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.05.014>
- Guzman, C. A., & Feuerstein, G. Z. (2013). Pharmaceutical biotechnology. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 15, Issue 6). [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(04\)00147-8](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(04)00147-8)
- Haberkorn, U. (2007). What is cancer? *Advances in Nuclear Oncology*., 62(4), 1–16. <https://doi.org/10.3109/9781420091380-2>
- Hafeez, U., Gan, H. K., & Scott, A. M. (2018). Monoclonal antibodies as immunomodulatory therapy against cancer and autoimmune diseases. *Current Opinion in Pharmacology*, 41, 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.05.010>
- Han, W., Yan, Y., Gu, J., Shi, Y., Tang, J., & Li, Y. (2016). Techno-economic analysis of a novel bioprocess combining solid state fermentation and dark fermentation for H<sub>2</sub> production from food waste. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(48), 22619–22625. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.09.047>
- Hanack, K., Messerschmidt, K., & Listek, M. (2016). Antibodies and selection of monoclonal antibodies. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 917, 11–22. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-32805-8\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-32805-8_2)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Harkins, K. R. (2000). Antibody purification methods. In *Basic Methods in Antibody Production and Characterization* (pp. 141–168). <https://doi.org/10.1201/9781420036534.ch11>
- Haro Salvatierra, E., Noboa J, A. P., Lupera, H., Terán, F., Troconis, E., & Colmener

- Roman, L. F. (2019). Parámetros de la 18F-FDG PET/CT asociado con los factores pronósticos en la estadificación inicial del Cáncer de Mama. *Oncología (Ecuador)*, 29(2), 97–109. <https://doi.org/10.33821/88>
- Hollevoet, K., & Declerck, P. J. (2017). State of play and clinical prospects of antibody gene transfer. *Journal of Translational Medicine*, 15(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1234-4>
- Hong, J. K., Lakshmanan, M., Goudar, C., & Lee, D. Y. (2018). Towards next generation CHO cell line development and engineering by systems approaches. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 22, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2018.08.002>
- Instituto Europeo de Bioinformática. (2002). *UniProt*. FGFR2 - Fibroblast Growth Factor Receptor 2 - Homo Sapiens (Human). <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P21802/entry#showFeaturesTable>
- Irigoyen, P., Moreno, A., & Gavilanes, C. (2018). Budget Impact Analysis of Adjuvant Pertuzumab and Trastuzumab in Early HER2-Positive Breast Cancer in Specialties Hospital In Ecuador. *Value in Health*, 21, S22. <https://doi.org/10.1016/j.jval.2018.04.136>
- Jassal, B., Matthews, L., Viteri, G., Gong, C., Lorente, P., Fabregat, A., Sidiropoulos, K., Cook, J., Gillespie, M., Haw, R., Loney, F., May, B., Milacic, M., Rothfels, K., Sevilla, C., Shamovsky, V., Shorsler, S., Varusai, T., Weiser, J., ... D'Eustachio, P. (2020). The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D498–D503. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1031>
- Jiménez-García, B., Pons, C., & Fernández-Recio, J. (2013). pyDockWEB: A web server for rigid-body protein-protein docking using electrostatics and desolvation scoring. *Bioinformatics*, 29(13), 1698–1699. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt262>
- Kang, T. H., & Jung, S. T. (2019). Boosting therapeutic potency of antibodies by taming Fc domain functions. *Experimental and Molecular Medicine*, 51(11). <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0345-9>
- Katoh, M. (2011). FGFR2 (fibroblast growth factor receptor 2). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, 7. <https://doi.org/10.4267/2042/44511>
- Katoh, Y. (2009). FGFR2-related pathogenesis and FGFR2-targeted therapeutics (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 23(4), 5. <https://doi.org/10.3892/ijmm>
- Kim, J. Y., Kim, Y. G., & Lee, G. M. (2012). CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: Current state and further potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(3), 917–930. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3758-5>
- King, D. (2005). Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies. In *Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies* (British Li). Taylor & Francis. <https://doi.org/10.4324/9780203211694>

- Kingston, R. E., Kaufman, R. J., Bebbington, C. R., & Rolfe, M. R. (2002). Amplification using CHO cell expression vectors. *Current Protocols in Molecular Biology / Edited by Frederick M. Ausubel ... [et Al.]*, Chapter 16(1), 16.23.1-16.23.13. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1623s60>
- Knox, R., Nettleship, J. E., Chang, V. T., Hui, Z. K., Santos, A. M., Rahman, N., Ho, L. P., Owens, R. J., & Davis, S. J. (2013). A streamlined implementation of the glutamine synthetase-based protein expression system. *BMC Biotechnology*, 13. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-74>
- Kondo, T., Oka, T., Sato, H., Shinnou, Y., & Washio, K. (2009). Accumulation of aberrant CpG hypermethylation by *Helicobacter pylori* infection promotes development. *International Journal of Oncology*, 35, 547–557. <https://doi.org/10.3892/ijo>
- Konning, D., Hinz, S. C., Grzeschik, J., Schröter, C., Krah, S., Zielonka, S., & Kolmar, H. (2018). Antibody Engineering Methods and Protocols. In *Antibody Engineering: Methods and Protocols* (Humana Pre).
- Korgaonkar, N., & Yadav, K. S. (2019). Understanding the biology and advent of physics of cancer with perspicacity in current treatment therapy. *Life Sciences*, 239, 117060. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.117060>
- Langjahr, P., & Sotelo, P. (2016). Present and future of therapeutic recombinant antibodies. *Memorias Del Instituto de Investigaciones En Ciencias de La Salud*, 14(2), 110–121. [https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2016.014\(02\)110-121](https://doi.org/10.18004/mem.iics/1812-9528/2016.014(02)110-121)
- Li, F., Vijayasankaran, N., Shen, A., Kiss, R., & Amanullah, A. (2010). Cell culture processes for monoclonal antibody production. *MAbs*, 2(5), 466–479. <https://doi.org/10.4161/mabs.2.5.12720>
- Lin, P. C., Chan, K. F., Kiess, I. A., Tan, J., Shahreel, W., Wong, S. Y., & Song, Z. (2019). Attenuated glutamine synthetase as a selection marker in CHO cells to efficiently isolate highly productive stable cells for the production of antibodies and other biologics. *MAbs*, 11(5), 965–976. <https://doi.org/10.1080/19420862.2019.1612690>
- Lin, W. Z., Lee, S. S. T., & Cheung, W. T. (2009). Efficient expression of foreign genes in CHO DHFR- cells by electroporation. *Biologicals*, 37(5), 277–281. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.03.003>
- López-Cortés, A., Paz-y-Miño, C., Guerrero, S., Cabrera-Andrade, A., Barigye, S. J., Munteanu, C. R., González-Díaz, H., Pazos, A., Pérez-Castillo, Y., & Tejera, E. (2020). OncoOmics approaches to reveal essential genes in breast cancer: a panoramic view from pathogenesis to precision medicine. *Scientific Reports*, 10(1), 1–21. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62279-2>
- Lu, R. M., Hwang, Y. C., Liu, I. J., Lee, C. C., Tsai, H. Z., Li, H. J., & Wu, H. C. (2020). Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *Journal of Biomedical Science*, 27(1), 1–30. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0592-z>

- Madej, T., Lanczycki, C. J., Zhang, D., Thiessen, P. A., Geer, R. C., Marchler-Bauer, A., & Bryant, S. H. (2014). MMDB and VAST+: Tracking structural similarities between macromolecular complexes. *Nucleic Acids Research*, *42*(D1), 297–303. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1208>
- Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell*, *129*(7), 1261–1274. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.009>
- Marissen, W. E. (2014). Production of Human Monoclonal Antibodies using Mammalian Expression Systems. In *Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research and Prevention* (Vol. 1). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800014-4.00026-3>
- Martin, A. J., Grant, A., Ashfield, A. M., Palmer, C. N., Baker, L., Quinlan, P. R., Purdie, C. A., Thompson, A. M., Jordan, L. B., & Berg, J. N. (2011). FGFR2 protein expression in breast cancer: Nuclear localisation and correlation with patient genotype. *BMC Research Notes*, *4*. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-72>
- Maschke, R. W., Seidel, S., Bley, T., Eibl, R., & Eibl, D. (2022). Determination of culture design spaces in shaken disposable cultivation systems for CHO suspension cell cultures. *Biochemical Engineering Journal*, *177*(June 2021), 108224. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.108224>
- McCabe, K. W. (2009). Patent protection for therapeutic monoclonal antibodies - Part 1. *MAbs*, *1*(4), 382–384. <https://doi.org/10.4161/mabs.1.4.8860>
- McKeage, K., & Perry, C. M. (2002). Trastuzumab: A review of its use in the treatment of metastatic breast cancer overexpressing HER2. *Drugs*, *62*(1), 209–243. <https://doi.org/10.2165/00003495-200262010-00008>
- Meibohm, B. (2006). *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Biotech Drugs* (WILEY-VCH).
- Meibohm, B., Sindelar, R., & Crommelin, D. (2019). Pharmaceutical biotechnology Fundamentals and Applications. In *Current Opinion in Biotechnology* (Fifht Edit, Vol. 14, Issue 6). Springer Nature Switzerland. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2003.10.008>
- Mello, R. A. de, Tavares, Á., & Mountzios, G. (2015). International Manual of Oncology Practice. (iMOP) - Principles of Medical Oncology. In *Springer International Publishing*. eBook.
- Mendelsohn, J., Gray, J. W., Howley, P. M., Israel, M. A., & Thompson, C. B. (2014). The Molecular Basis of Cancer: Fourth Edition. In *The Molecular Basis of Cancer: Fourth Edition* (Elsevier).
- Merrill, R. M. (2002). Cancer Precursors: Epidemiology, Detection, and Prevention. In *American Journal of Epidemiology* (Springer, Vol. 156, Issue 3). <https://doi.org/10.1093/aje/kwf041>
- Meyer, K. B., Maia, A. T., O'Reilly, M., Teschendorff, A. E., Chin, S. F., Caldas, C., & Ponder, B. A. J. (2008). Allele-specific up-regulation of FGFR2 increases susceptibility to breast cancer. *PLoS Biology*, *6*(5), 1098–1103. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060108>



- Milling, L., Zhang, Y., & Irvine, D. J. (2017). Delivering safer immunotherapies for cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *114*, 79–101. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.05.011>
- Mitsopoulos, C., Di Micco, P., Fernandez, E. V., Dolciemi, D., Holt, E., Mica, I. L., Coker, E. A., Tym, J. E., Campbell, J., Che, K. H., Ozer, B., Kannas, C., Antolin, A. A., Workman, P., & Al-Lazikani, B. (2021). CanSAR: Update to the cancer translational research and drug discovery knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, *49*(D1), D1074–D1082. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1059>
- Moiani, D., Salvalaglio, M., Cavallotti, C., Bujacz, A., Redzynia, I., Bujacz, G., Dinon, F., Pengo, P., & Fassina, G. (2009). Structural characterization of a protein a mimetic peptide dendrimer bound to human IgG. *Journal of Physical Chemistry B*, *113*(50), 16268–16275. <https://doi.org/10.1021/jp909405b>
- Moorkens, E., Vulto, A. G., & Huys, I. (2020). An overview of patents on therapeutic monoclonal antibodies in Europe: are they a hurdle to biosimilar market entry? *MAbs*, *12*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1080/19420862.2020.1743517>
- Moriarty, K. J., Koblisch, H., Johnson, D. L., & Galemno, R. A. (2007). *Progress in the Development of Agents to Control the Cell Cycle*. [https://doi.org/10.1007/7355\\_2006\\_006](https://doi.org/10.1007/7355_2006_006)
- Nakamura, T., & Omasa, T. (2015). Optimization of cell line development in the GS-CHO expression system using a high-throughput, single cell-based clone selection system. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *120*(3), 323–329. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.01.002>
- Norman, R. A., Ambrosetti, F., Bonvin, A. M. J. J., Colwell, L. J., Kelm, S., Kumar, S., & Krawczyk, K. (2020). Computational approaches to therapeutic antibody design: Established methods and emerging trends. *Briefings in Bioinformatics*, *21*(5), 1549–1567. <https://doi.org/10.1093/bib/bbz095>
- O’Flaherty, R., Bergin, A., Flampouri, E., Mota, L. M., Obaidi, I., Quigley, A., Xie, Y., & Butler, M. (2020). Mammalian cell culture for production of recombinant proteins: A review of the critical steps in their biomanufacturing. *Biotechnology Advances*, *43*(March), 107552. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107552>
- Omasa, T., Onitsuka, M., & Kim, W.-D. (2010). Cell Engineering and Cultivation of Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *11*(3), 233–240. <https://doi.org/10.2174/138920110791111960>
- OpenStx College. (2013). *Biology* (Rice Unive). [https://cnx.org/contents/GFy\\_h8cu@9.85:H4oMpCSi@7/Signaling-Molecules-and-Cellular-Receptors](https://cnx.org/contents/GFy_h8cu@9.85:H4oMpCSi@7/Signaling-Molecules-and-Cellular-Receptors)
- Orellana, C. A., Marcellin, E., Schulz, B. L., Nouwens, A. S., Gray, P. P., & Nielsen, L. K. (2015). High-antibody-producing chinese hamster ovary cells up-regulate intracellular protein transport and glutathione synthesis. *Journal of Proteome Research*, *14*(2), 609–618. <https://doi.org/10.1021/pr501027c>
- Ortega Quintana, F. A., Alvarez Zapata, H., & Botero Castro, H. A. (2017). Enfrentando el modelado de bioprocesos: una revisión de las metodologías de modelado. *ION*,

- Investigación, Optimización y Nuevos Procesos En Ingeniería*, 30(1), 74. <https://doi.org/10.18273/revion.v30n1-2017006>
- Papathanasiou, M. M., & Kontoravdi, C. (2020). Engineering challenges in therapeutic protein product and process design. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 27, 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2019.11.010>
- Paredes, B., Montalvo, A., & Costa, R. (2017). *Estrategia Nacional para la atención integral del cáncer en el Ecuador* (Issue 593 2).
- Pereira, C. G., Lavoie, J. R., Garces, E., Basso, F., Dabić, M., Porto, G. S., & Daim, T. (2019). Forecasting of emerging therapeutic monoclonal antibodies patents based on a decision model. *Technological Forecasting and Social Change*, 139(May), 185–199. <https://doi.org/10.1016/j.techfore.2018.11.002>
- Perfetto, L., Briganti, L., Calderone, A., Perpetuini, A. C., Iannuccelli, M., Langone, F., Licata, L., Marinkovic, M., Mattioni, A., Pavlidou, T., Peluso, D., Petrilli, L. L., Pirró, S., Posca, D., Santonico, E., Silvestri, A., Spada, F., Castagnoli, L., & Cesareni, G. (2016). SIGNOR: A database of causal relationships between biological entities. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D548–D554. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKV1048>
- Pörtner, R. (2020). *Animal Cell Biotechnology* (Humana Pre). Springer Science + Business Media New York. <http://www.springer.com/series/7651>
- Prieto-Martínez, F. D., Arciniega, M., & Medina-Franco, J. L. (2018a). Acoplamiento Molecular: Avances Recientes y Retos. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 21, 23. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.143>
- Prieto-Martínez, F. D., Arciniega, M., & Medina-Franco, J. L. (2018b). Acoplamiento Molecular: Avances Recientes y Retos. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 21, 65–87. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2018.0.143>
- Primicias. (2022). *11 hospitales y clínicas privadas dejarán de recibir pacientes derivados del IESS*. Salud Pública. <https://www.primicias.ec/noticias/sociedad/hospitales-clinicas-dejaran-recibir-pacientes-iess/>
- Ramos-de-la-Peña, A. M., González-Valdez, J., & Aguilar, O. (2019). Protein A chromatography: Challenges and progress in the purification of monoclonal antibodies. *Journal of Separation Science*, 42(9), 1816–1827. <https://doi.org/10.1002/jssc.201800963>
- Rédei, G. P. (2008). Blast (basic local alignment search tool). In *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics* (pp. 221–221). [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6754-9\\_1879](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6754-9_1879)
- Roberts, A. B. (2019). Molecular and cell biology of Cancer. In *Mineral and Electrolyte Metabolism* (Vol. 24, Issues 2–3). <https://doi.org/10.1159/000057358>
- Robinson, D. K., Chan, C. P., Yu Lp, C., Tsai, P. K., Tung, J., Seamans, T. C., Lenny, A. B., Lee, D. K., Irwin, J., & Silberklang, M. (1994). Characterization of a recombinant antibody produced in the course of a high yield fed-batch process.

- Rodchenkov, I., Babur, O., Luna, A., Aksoy, B. A., Wong, J. V., Fong, D., Franz, M., Siper, M. C., Cheung, M., Wrana, M., Mistry, H., Mosier, L., Dlin, J., Wen, Q., O'Callaghan, C., Li, W., Elder, G., Smith, P. T., Dallago, C., ... Sander, C. (2020). Pathway Commons 2019 Update: Integration, analysis and exploration of pathway data. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D489–D497. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz946>
- Ruales, J., & Checa, F. (2018). La atención del cáncer en el Ecuador: pasado, presente y futuro. *Revista de La Facultad de Ciencias Médicas (Quito)*, 43(1), 46–59. [https://doi.org/10.29166/ciencias\\_medicas.v43i1.1456](https://doi.org/10.29166/ciencias_medicas.v43i1.1456)
- Ruddon, R. W. (2007a). Cancer Biology. In *Cancer biology* (Oxford Uni). University of Michigan Medical School.
- Ruddon, R. W. (2007b). Characteristics of human cancer. In *Cancer biology* (Fourth Edi). OXFORD University Press.
- Schlender, M., Hernandez-Villafuerte, K., Cheng, C. Y., Mestre-Ferrandiz, J., & Baumann, M. (2021). How Much Does It Cost to Research and Develop a New Drug? A Systematic Review and Assessment. *PharmacoEconomics*, 39(11), 1243–1269. <https://doi.org/10.1007/s40273-021-01065-y>
- Servicio Nacional de Derechos Intelectuales. (2010). RESOLUCIÓN No. 10-04 P-IEPI. *Instituto Ecuatoriano de Propiedad Intelectual*, 10, 10. <https://www.derechosintelectuales.gob.ec/>
- Shukla, A. A., & Thömmes, J. (2010). Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins. *Trends in Biotechnology*, 28(5), 9. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.02.001>
- Si, Y., Melkonian, A. L., Curry, K. C., Xu, Y., Tidwell, M., Liu, M., Zaky, A. F., & Liu, X. (Margaret). (2021). Monoclonal antibody-based cancer therapies. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 30, 301–307. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2020.11.009>
- Simpson, A., & Caballero, O. (2014). Monoclonal antibodies for the therapy of cancer. *BMC Proceedings*, 8(S4), 6–8. <https://doi.org/10.1186/1753-6561-8-s4-o6>
- Sisodiya, D., Pandey, P., & Dashora, K. (2012). Drug Designing Softwares and Their Applications in New Drug Discover. *Journal of Pharmacy Research*, 5(1), 124–126. <http://www.schrodinger.com/products/14/7>.
- SOLCA. (2019). Epidemiología del Cáncer en Quito. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9). <https://drive.google.com/file/d/1dg3Yy0PqWt9ZoG-YN17sJpk7A0Q-v2Js/view>
- Steinebach, F., Ulmer, N., Wolf, M., Decker, L., Schneider, V., Wälchli, R., Karst, D., Souquet, J., & Morbidelli, M. (2017). Design and operation of a continuous integrated monoclonal antibody production process. *Biotechnology Progress*, 33(5), 1303–1313. <https://doi.org/10.1002/btpr.2522>

- Steinitz, M. (2019). Human Monoclonal Antibodies - Methods and Protocols. In T. H. University (Ed.), *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition* (Humana Pre). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00969-4>
- Stelzer, G., Rosen, N., Plaschkes, I., Zimmerman, S., Twik, M., Fishilevich, S., Iny Stein, T., Nudel, R., Lieder, I., Mazor, Y., Kaplan, S., Dahary, D., Warshawsky, D., Guan-Golan, Y., Kohn, A., Rappaport, N., Safran, M., & Lancet, D. (2016). The GeneCards suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses. *Current Protocols in Bioinformatics*, 2016(June), 1.30.1-1.30.33. <https://doi.org/10.1002/cpbi.5>
- Strohl, W. (2012). *Therapeutic antibody engineering* (Cambridge). Woodhead Publishing Limited.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Swindells, M. B., Porter, C. T., Couch, M., Hurst, J., Abhinandan, K. R., Nielsen, J. H., Macindoe, G., Hetherington, J., & Martin, A. C. R. (2017). abYsis: Integrated Antibody Sequence and Structure—Management, Analysis, and Prediction. *Journal of Molecular Biology*, 429(3), 356–364. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.019>
- Taefehshokr, N., Baradaran, B., Baghbanzadeh, A., & Taefehshokr, S. (2020). Promising approaches in cancer immunotherapy. *Immunobiology*, 225(2). <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2019.11.010>
- Tapia Granados, J. A. (2005). [Prevalence measures and the incidence-prevalence ratio]. *Medicina Clinica*, 105(6), 216–218. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7658739>
- Thermo Fisher Scientific. (2020). *Medios de cultivo celular CHO*. Ciencias de La Vida. <https://www.thermofisher.com/ec/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/serum-free-media/cho-cell-culture-media.html>
- Thomas, C., & Gustafsson, J. Å. (2011). The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 11, Issue 8, pp. 597–608). <https://doi.org/10.1038/nrc3093>
- Tihanyi, B., & Nyitray, L. (2020). Recent advances in CHO cell line development for recombinant protein production. *Drug Discovery Today: Technologies*, 38(xx), 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2021.02.003>
- Tiller, K. E., & Tessier, P. M. (2015). Advances in Antibody Design. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 17(August), 191–216. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071114-040733>
- Treish, I., Schwartz, R., & Lindley, C. (2001). Pharmacology and therapeutic use of trastuzumab in breast cancer. *Oncology Spectrums*, 2(2), 115–127. <https://doi.org/10.1093/ajhp/57.22.2077>
- Turner, N., & Grose, R. (2010). Fibroblast growth factor signalling: From development

- to cancer. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 10, Issue 2, pp. 116–129). <https://doi.org/10.1038/nrc2780>
- Velugula-Yellela, S. R., Powers, D. N., Angart, P., Faustino, A., Faison, T., Kohnhorst, C., Fratz-Berilla, E. J., & Agarabi, C. D. (2019). Purification and analytics of a monoclonal antibody from Chinese hamster ovary cells using an automated microbioreactor system. *Journal of Visualized Experiments*, 2019(147), 1–10. <https://doi.org/10.3791/58947>
- Villacrés, C., Tayi, V. S., & Butler, M. (2021). Strategic feeding of NS0 and CHO cell cultures to control glycan profiles and immunogenic epitopes of monoclonal antibodies. *Journal of Biotechnology*, 333(November 2020), 49–62. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.04.005>
- Vispo, N. S. (2016). Terapias anticáncer. *Revista Bionatura*, June, 3.
- Wagener, C., Stocking, C., & Muller, O. (2017). *Cancer signaling from molecular biology to targeted therapy* (Wiley-VCH).
- Walsh, G. (2014). Biopharmaceutical benchmarks 2014. *Nature Biotechnology*, 32(10), 992–1000. <https://doi.org/10.1038/nbt.3040>
- Walsh, G. (2016). Biopharmaceuticals Second Edition. In L. John Wiley & Sons (Ed.), *Wiley* (Wiley, Vol. 2, Issue 1). University of Limerick.
- Warren L. DeLano. (2019, December 13). *PyMOL* | [pymol.org](http://pymol.org). Software Schrödinger. <https://pymol.org/2/#page-top>
- Weinberg, R. (2014). *The biology of cancer Second Edition* (Garland Sc).
- Weiner, L. M., Dhodapkar, M. V., & Ferrone, S. (2009). Monoclonal antibodies for cancer immunotherapy. *The Lancet*, 373(9668), 1033–1040. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60251-8)
- Wishart, D. S., Feunang, Y. D., Guo, A. C., Lo, E. J., Marcu, A., Grant, J. R., Sajed, T., Johnson, D., Li, C., Sayeeda, Z., Assempour, N., Iynkkaran, I., Liu, Y., MacIejewski, A., Gale, N., Wilson, A., Chin, L., Cummings, R., Le, Di., ... Wilson, M. (2018). DrugBank 5.0: A major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D1074–D1082. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1037>
- Yin, Y., Djakovic, S., Marsters, S., Tien, J., Peng, J., Tremayne, J., Lee, G., Neve, R. M., Wu, Y., Merchant, M., Ashkenazi, A., & Carter, P. J. (2015). Redesigning a monospecific anti-FGFR3 antibody to add selectivity for FGFR2 and expand antitumor activity. *Molecular Cancer Therapeutics*, 14(10), 2270–2278. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-14-1050>
- Yuan, S., Chan, H. C. S., & Hu, Z. (2017). Using PyMOL as a platform for computational drug design. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 7(2), 1–10. <https://doi.org/10.1002/wcms.1298>
- Zahn-Zabal, M., Michel, P. A., Gateau, A., Nikitin, F., Schaeffer, M., Audot, E., Gaudet, P., Duek, P. D., Teixeira, D., De Laval, V. R., Samarasinghe, K., Bairoch, A., & Lane, L. (2020). The neXtProt knowledgebase in 2020: Data, tools and

usability improvements. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D328–D334. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz995>

Zhang, X., Ibrahimi, O. A., Olsen, S. K., Umemori, H., Mohammadi, M., & Ornitz, D. M. (2006). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family: The complete mammalian FGF family. *Journal of Biological Chemistry*, 281(23), 15694–15700. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601252200>

Ziegelbauer, K., & Light, D. R. (2008). Monoclonal antibody therapeutics: Leading companies to maximise sales and market share. *Journal of Commercial Biotechnology*, 14(1), 65–72. <https://doi.org/10.1057/palgrave.jcb.3050081>



**Anexo 2.** Tabla de tipos de cáncer por grupo etario reportados en el HSVP - Ibarra

<b>Tipos de cáncer HSVP periodo 2019-2020</b>								
<b>Número</b>	<b>Código</b>	<b>Nombre cáncer</b>	<b>Grupo etario</b>					<b>Total casos</b>
			<b>0-11 años (Niños)</b>	<b>12-17 años (Adolescentes)</b>	<b>18-29 años (Jóvenes)</b>	<b>30-64 años (Adultos)</b>	<b>65 años en adelante (Tercera Edad)</b>	
1	UT	Tumor en el útero	0	0	2	32	13	47
2	ES	Tumor en el estómago	0	0	4	13	24	41
3	RI	Tumor en el riñón	0	0	1	0	3	4
4	TI	Tumor de tiroides	1	0	6	45	9	61
5	LI	Tumor del sistema linfático (linfoma)	1	1	11	22	23	58
6	PA	Tumor del páncreas	0	0	0	6	9	15
7	PI	Tumor de la piel (melanoma)	0	0	1	16	31	48
8	PR	Tumor de próstata	0	0	0	2	36	38
9	PU	Tumor en el pulmón	0	0	0	6	11	17
10	MA	Tumor de la mama	1	2	9	84	19	115
11	HE	Tumor hepático	0	1	0	7	15	23
12	RET	Tumor	0	0	0	3	2	5



		retroperitoneo						
13	CAR	Tumor maligno del cardias	0	0	0	4	1	5
14	NA	Tumor de la nariz	0	0	0	1	3	4
15	OJ	Tumor en el ojo	0	0	0	1	2	3
16	VBI	Tumor de la vesícula biliar	0	0	0	7	9	16
17	LE	Leucemia	4	1	4	4	3	16
18	MI	Tumor en la médula ósea (mieloma)	0	0	0	5	2	7
19	END	Tumor en el endocervix	0	0	0	8	1	9
20	EX	Tumor del exocervix	0	0	0	39	13	52
21	AM	Tumor de ampolla de váter	0	0	0	2	1	3
22	TC	Tumor del tejido conjuntivo	1	0	3	11	4	19
23	TE	Tumor en los testículos	0	0	8	6	1	15
24	OV	Tumor en el ovario	0	1	2	19	10	32
25	HU	Tumor maligno de	2	2	3	4	1	12

		los huesos						
26	RE	Tumor en el recto	0	0	0	10	8	18
27	AN	Tumor maligno del ano	0	0	0	3	3	6
28	AB	Tumor maligno del abdomen	0	0	0	4	5	9
29	GL	Tumor de la laringe (glotis)	0	0	0	0	3	3
30	GP	Tumor de la glándula parótida	0	0	0	0	3	3
31	PEL	Tumor en la pelvis	0	0	0	2	2	4
32	CER	Tumor cerebral	0	1	1	8	1	11
33	CO	Tumor en el colón	0	0	0	13	12	25
34	TO	Tumor en el tórax	0	0	0	2	2	4
35	PE	Tumor en el pene	0	0	0	6	3	9
36	ENC	Tumor en el encéfalo	1	0	1	10	10	22
37	VB	Tumor en vías biliares	0	0	0	4	8	12
38	ESO	Tumor en el esófago	0	0	0	1	7	8
39	EB	Tumor en el epitelio	0	0	0	1	0	1

		bucal						
40	PAL	Tumor en el paladar	0	0	0	0	1	1
41	MU	Tumor de la mucosa de la mejilla	0	0	0	1	2	3
42	ME	Tumor mediastino	0	0	1	1	0	2
43	UR	Tumor de unión rectosigmoidea	0	0	0	0	1	1
44	ENCI	Tumor en la encía	0	0	0	0	1	1
45	VU	Tumor en la vulva	0	0	0	1	0	1
46	ENDO	Tumor en el endometrio	0	0	1	5	4	10
47	CA	Tumor en la cabeza	0	0	0	1	1	2
48	AP	Tumor en el antro pilórico	0	0	0	4	6	10
49	CV	Tumor en la columna vertebral	0	0	0	0	3	3
50	TF	Tumor en las trompas de falopio	0	0	0	1	0	1
51	MIO	Tumor en el	0	0	0	1	0	1

		miometrio						
52	LEN	Tumor en la lengua	0	0	0	1	0	1
53	VE	Tumor en la vejiga	0	0	0	2	5	7
54	DU	Tumor en el duodeno	0	0	0	4	1	5
55	OR	Tumor de la orofaringe	0	0	0	0	1	1
56	PERI	Tumor en el peritoneo	0	0	0	0	1	1
57	TIM	Tumor en el timo	0	0	0	0	1	1

**Anexo 3.** Tabla Tipos de cáncer por sexo reportados en el HSVP - Ibarra

<b>Tipos de cáncer HSVP periodo 2019-2020</b>					
<b>Número</b>	<b>Código</b>	<b>Nombre cáncer</b>	<b>Sexo</b>		<b>Total casos</b>
			<b>Femenino</b>	<b>Masculino</b>	
1	UT	Tumor en el útero	47	0	47
2	ES	Tumor en el estómago	23	18	41
3	RI	Tumor en el riñón	1	3	4
4	TI	Tumor de tiroides	52	9	61
5	LI	Tumor del sistema linfático (linfoma)	22	36	58
6	PA	Tumor del páncreas	12	3	15
7	PI	Tumor de la piel (melanoma)	28	20	48
8	PR	Tumor de próstata	0	38	38
9	PU	Tumor en el pulmón	13	4	17
10	MA	Tumor de la mama	114	1	115
11	HE	Tumor hepático	14	9	23
12	RET	Tumor retroperitoneo	3	2	5
13	CAR	Tumor maligno del cardias	3	2	5
14	NA	Tumor de la nariz	4	0	4

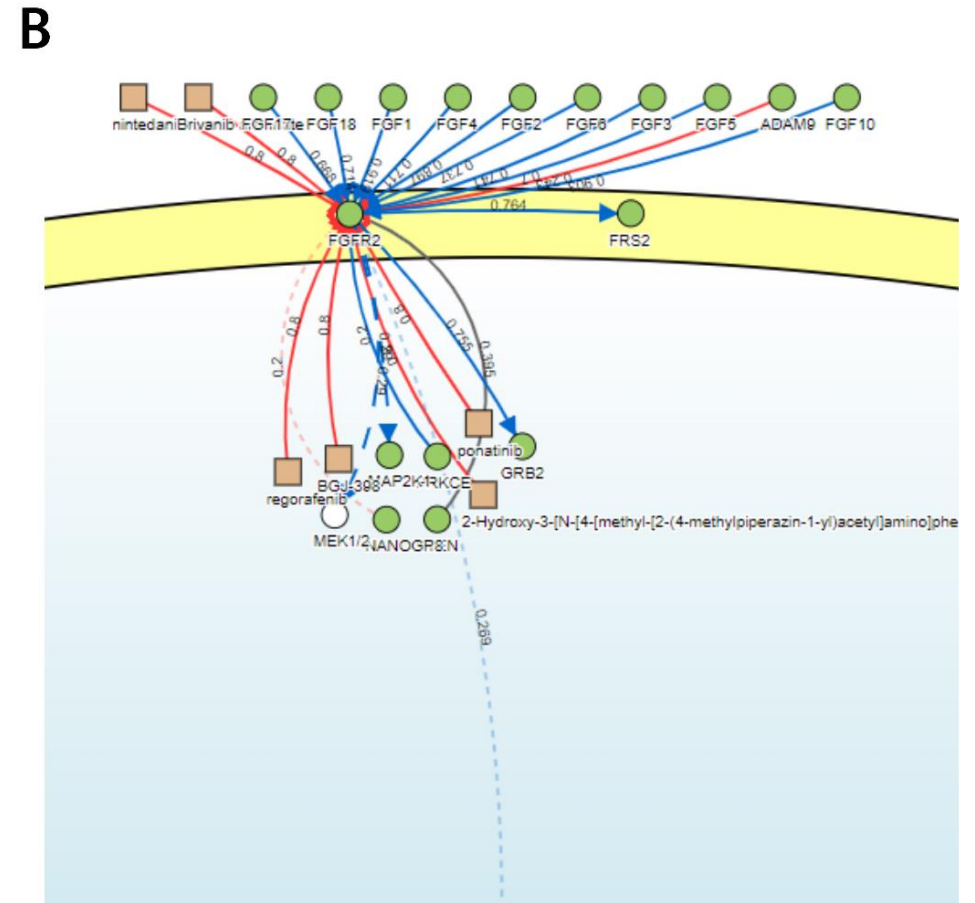
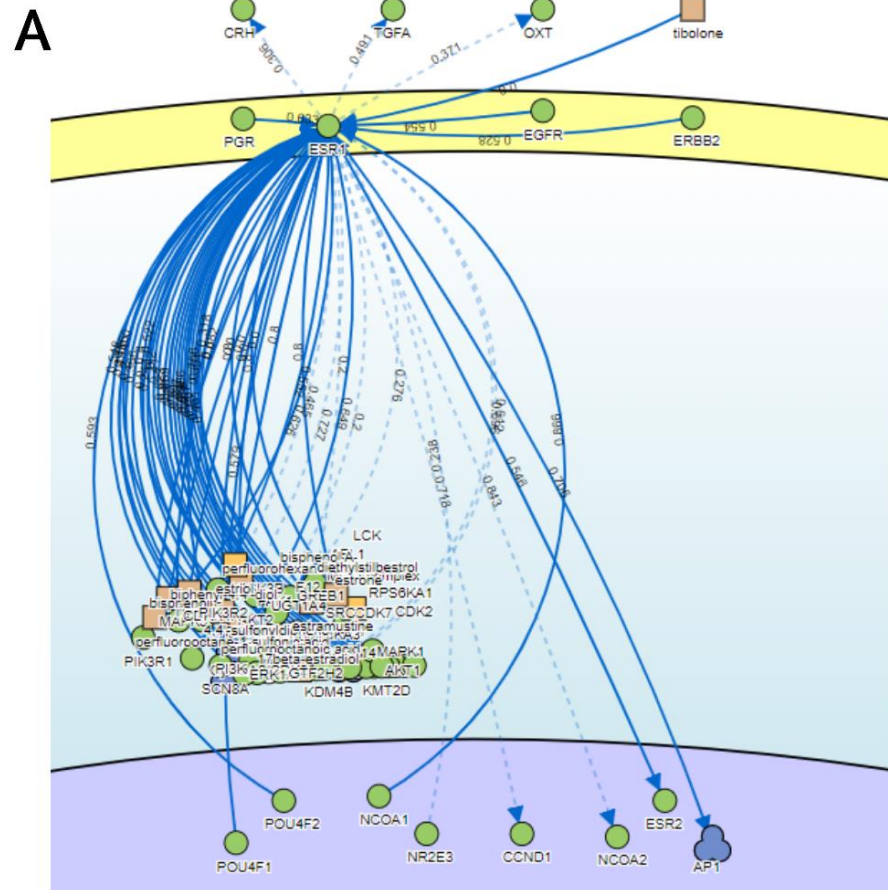
15	OJ	Tumor en el ojo	2	1	3
16	VBI	Tumor de la vesícula biliar	10	6	16
17	LE	Leucemia	10	6	16
18	MI	Tumor en la médula ósea (mieloma)	1	6	7
19	END	Tumor en el endocérvix	9	0	9
20	EX	Tumor del exocérvix	52	0	52
21	AM	Tumor de ampolla de váter	2	1	3
22	TC	Tumor del tejido conjuntivo	10	9	19
23	TE	Tumor en los testículos	0	15	15
24	OV	Tumor en el ovario	32	0	32
25	HU	Tumor maligno de los huesos	4	8	12
26	RE	Tumor en el recto	11	7	18
27	AN	Tumor maligno del ano	5	1	6
28	AB	Tumor maligno del abdomen	7	2	9
29	GL	Tumor de la laringe (glotis)	0	3	3
30	GP	Tumor de la glándula parótida	2	1	3
31	PEL	Tumor en la pelvis	4	0	4
32	CER	Tumor cerebral	7	4	11
33	CO	Tumor en el colón	14	11	25
34	TO	Tumor en el tórax	3	1	4
35	PE	Tumor en el pene	0	9	9
36	ENC	Tumor en el encéfalo	17	5	22
37	VB	Tumor en vías biliares	7	5	12
38	ESO	Tumor en el esófago	3	5	8
39	MU	Tumor de la mucosa de la mejilla	3	0	3
40	ME	Tumor mediastino	0	2	2
41	ENDO	Tumor en el endometrio	10	0	10
42	CA	Tumor en la cabeza	0	2	2
43	AP	Tumor en el antro pilórico	6	4	10
44	CV	Tumor en la columna vertebral	2	1	3
45	VE	Tumor en la vejiga	1	6	7
46	DU	Tumor en el duodeno	5	0	5
47	EB	Tumor en el epitelio bucal	1	0	1
48	PAL	Tumor en el paladar	0	1	1

49	UR	Tumor de unión rectosigmoidea	0	1	1
50	ENCI	Tumor en la encía	0	1	1
51	VU	Tumor en la vulva	1	0	1
52	TF	Tumor en las trompas de falopio	1	0	1
53	MIO	Tumor en el miometrio	1	0	1
54	LEN	Tumor en la lengua	1	0	1
55	OR	Tumor de la orofaringe	0	1	1
56	PERI	Tumor en el peritoneo	1	0	1
57	TIM	Tumor en el timo	0	1	1

**Anexo 4.** Tipos de cáncer reportados según número total de casos en SOLCA

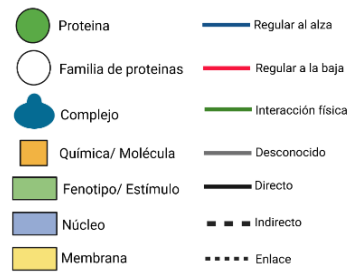
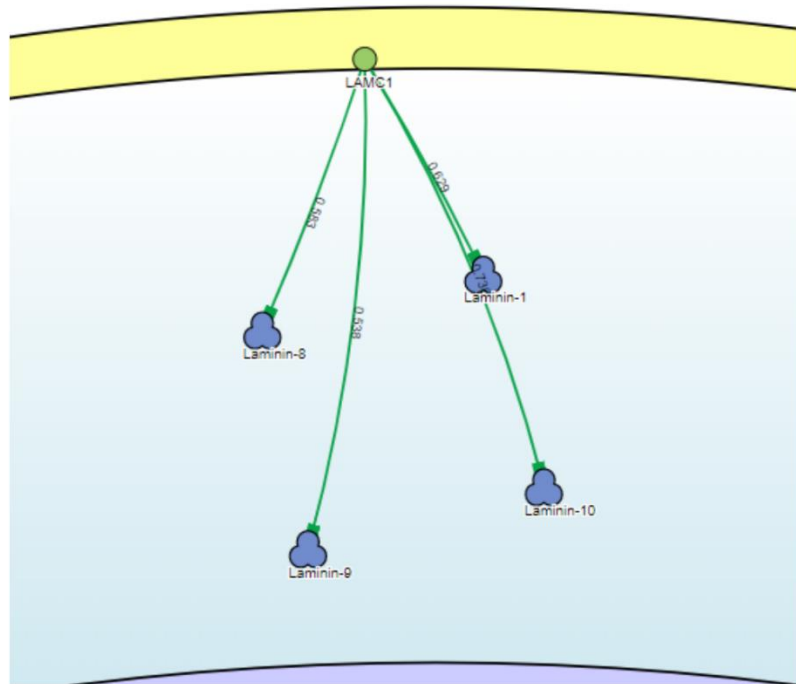
<b>Tipos de cáncer</b>	<b>2002</b>	<b>2003</b>	<b>2004</b>	<b>2005</b>	<b>2006</b>	<b>2007</b>	<b>2008</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>	<b>2012</b>	<b>2013</b>	<b>2014</b>	<b>2015</b>	<b>2016</b>	<b>2017</b>	<b>2018</b>	<b>2019</b>	<b>2020</b>	<b>Total</b>
Tumores Piel y Melanomas	10	18	18	11	8	23	16	23	24	35	32	29	44	25	45	41	32	31	57	<b>522</b>
Tumores Mamarios	0	6	8	12	17	16	18	17	24	28	26	26	31	19	48	43	62	63	68	<b>532</b>
Tumores Cabeza y Cuello (Tiroides, Partitoides, Submaxilar)	0	1	3	4	4	2	15	10	12	18	36	39	41	21	21	43	24	12	37	<b>343</b>
Tumores Ginecológicos	10	6	8	9	5	9	5	5	11	28	36	13	28	25	31	33	24	32	52	<b>370</b>
Tumores Mixtos (colon y Estómago)	7	6	5	9	8	10	15	18	23	32	38	23	16	18	13	9	2	7	0	<b>259</b>
Tumores Linfoma	1	1	0	3	0	1	0	1	4	6	7	6	5	5	5	8	1	2	0	<b>56</b>
Tumores Urológicos	0	0	2	0	0	1	1	0	0	5	4	2	0	1	0	1	0	0	0	<b>17</b>

**Anexo 5.** Vías de señalización de dianas terapéuticas: A) Receptor de estrógeno (*ESR1*), B) Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (*FGFR2*), C) Subunidad de laminina gamma 1 (*LAMC1*), D) Alfa serina / treonina-proteína quinasa (*AKT1*). Procedente de Perfetto et al., 2016.

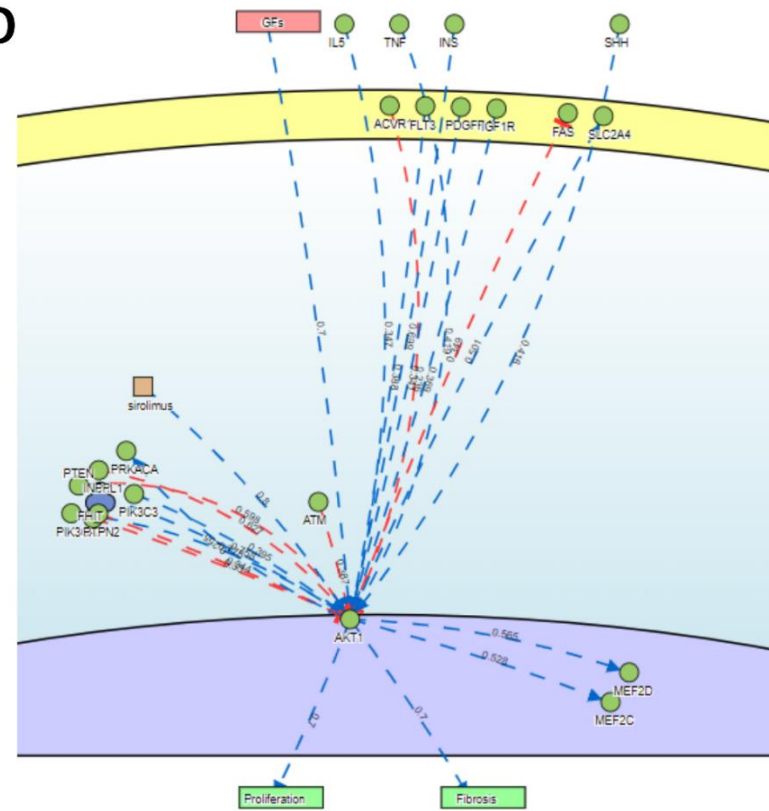




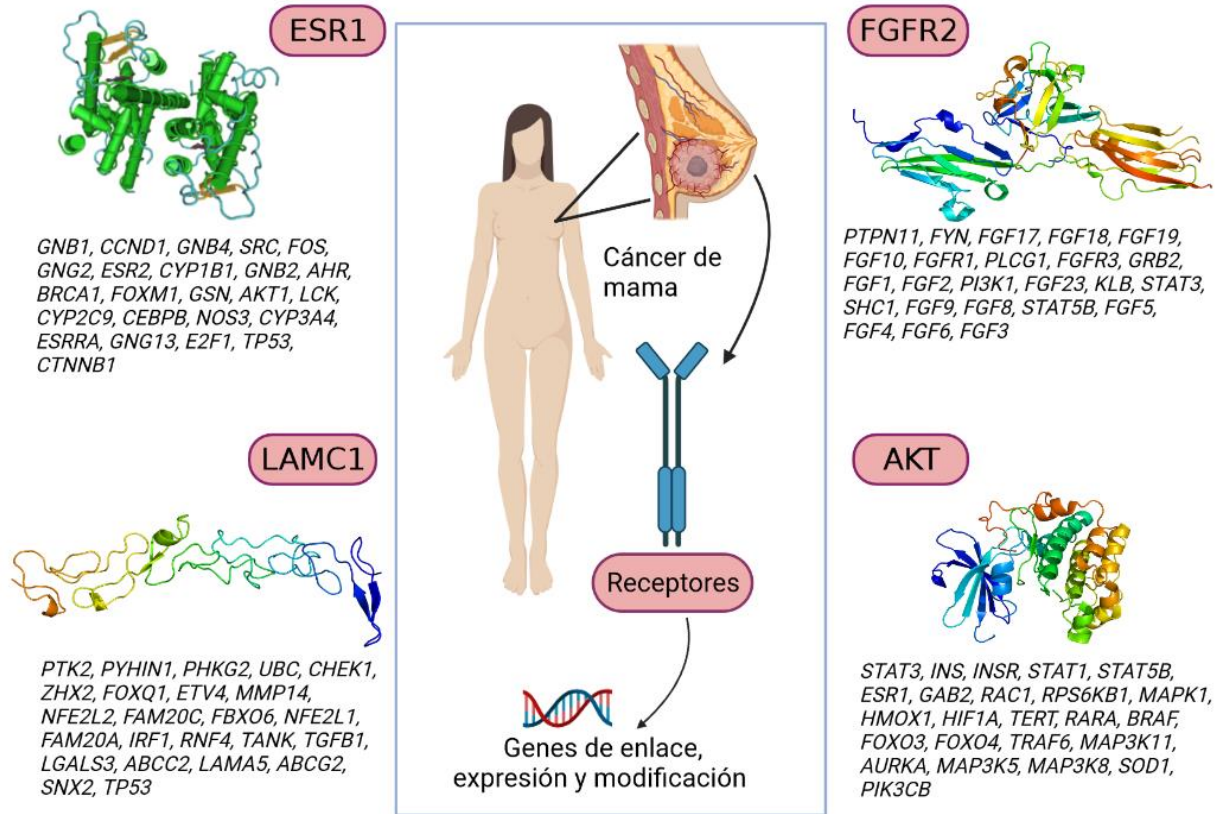
C



D



**Anexo 6.** Genes que interactúan con las dianas terapéuticas que intervienen en el proceso de desarrollo del cáncer de mama: Receptor de estrógeno (*ESR1*), Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (*FGFR2*), Subunidad de laminina gamma 1 (*LAMC1*), Alfa serina / treonina-proteína quinasa (*AKT1*). Adaptado de Rodchenkov et al., 2020.



**Anexo 7.** Proceso de elaboración del medio de cultivo GIBCO DG44

Elaboración del medio de cultivo:

Se determinó un proceso de elaboración del medio de cultivo para 1L de células CHO-DG44 en una botella de vidrio de 5 L agitada orbitalmente. El método es escalable y se puede realizar en otros contenedores.

Materiales:

1. Células CHO-DG44 adaptadas al cultivo en suspensión libre de suero.
2. Botellas de vidrio cilíndricas y cuadradas con volúmenes nominales de 100 mL a 5 L.
3. Medio ProCHO5 sin l-glutamina, hipoxantina, timidina y rojo fenol.
4. Solución roja de l-glutamina y fenol 50×. Una solución de stock con 200 mM de glutamina y 250 µg/mL de fenol rojo se hace disolviendo 29,23 g de glutamina y 250 mg de rojo fenol en 800 ml de agua. Después de la disolución completa, el volumen se ajusta a 1 L por adición adicional de agua. La solución es esterilizada por filtración a través de un filtro de tapa de botella Steritop de 0,2 µm con un tamaño del cuello de 45 mm La solución se transfiere a tubos centrífugos estériles de 50 ml y se mantuvo

congelado a -20 °C. Para cada litro de ProCHO5 medio, se añade 20 ml de la solución de stock.

5. Solución HT de 50×. Una solución de stock se hace disolviendo 680 mg de hipoxantina y 194 mg de timidina en 800 ml de agua. Después de la disolución completa, el volumen se ajusta a 1 L por adición de agua. La solución es esterilizada por filtración y congelación como alícuotas como se explica en el anterior paso. Por cada litro de ProCHO5 medio, se añade 20 mL de la solución stock.
6. Solución de azul tripano (0,4%).
7. Botellas centrífugas de 500 ml.
8. Microscopio de contraste de fase invertida.
9. Centrífuga de mesa estándar.
10. Agitador orbital (modelo ISF-4-W con un diámetro de rotación de 5 cm).
11. Cinta adhesiva de transferencia de doble cara. (Alves y Dobrowsky, 2017)

#### Métodos:

1. Subcultivar las células CHO-DG44 cada 3-4 días por inoculación en medio ProCHO5 de 100 ml (cuando se utiliza para células cultivo, el medio contiene l-glutamina, hipoxantina, timidina, y rojo fenol) en una botella de vidrio de forma cuadrada de 250 ml en una densidad celular inicial de  $0,3 \times 10^6$  células/ml.
2. Determinar la densidad celular y la viabilidad mediante la tinción azul de Tripano utilizando un hemocitómetro Neubauer y una fase invertida microscopio de contraste (100× de aumento).
3. Después del recuento de células, transfiera  $3 \times 10^7$  células a una centrífuga de mesa con un tubo de 500ml durante 3 min.
4. Retirar el medio por aspiración o decantación. Re suspender el pellet celular en 10 mL de medio ProCHO5 y transferir a una botella de forma cuadrada de 250 ml que contiene 90 ml de precalentado ProCHO5 medio. Conecte la botella a una plataforma montada en un agitador orbital usar cinta adhesiva de transferencia de doble cara y agitar en 110 rpm a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO2 sin humedad (Alves y Dobrowsky, 2017).

### **Anexo 8.** Proceso de cromatografía de afinidad de proteína A

1. Iniciación de la purificación
  - Equilibrar la columna con el búfer en un caudal de 2 mL/min durante 40 min.
  - En el colector de fracción, colocar tubos cónicos de 15 ml para recolectar el eludido de anticuerpos purificados.
2. Recolección de la muestra
  - Añadir el líquido de cultivo celular de cosecha filtrado de 0,22 µm a una jeringa vacía de 12 ml.
  - Colocar 10ml de muestra en el equipo de medición.
3. Ejecución del método de purificación
  - Equilibrar la columna con tres volúmenes de columna (CV) de tampón de equilibrio a un caudal de 2 ml/min.
  - Utilizar cuatro CV de 25 mM Tris con 1 M de NaCl a pH 7,5 para realizar un lavado secundario con alto contenido de sal a un caudal de 2 mL/min.
  - Después de la elución neutralice inmediatamente la proteína purificada usando 1 M de base Tris a un pH de ~ 5.5. Medir la concentración de proteína utilizando un espectrofotómetro UV-Vis a 280 nm y 260 nm y almacenar a 4 °C.

Concentración del anticuerpo purificado:

- Insertar filtros de 100 kDa en los tubos de la centrífuga. Centrifugar durante 10 min
- Lavar los filtros con 500  $\mu$ L de agua destilada, después invertir el filtro en un nuevo tubo de centrifuga para centrifugar durante 2 min a 1.000 x y recoger la muestra concentrada.
- Determinar las concentraciones de la muestra utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (Velugula-Yellela et al., 2019).

#### **Anexo 9.** Análisis de glicosilación mediante espectrometría de masas

1. Utilizar una concentración de anticuerpo de 2 mg/ml en un tampón de fosfato de sodio neutro.
2. Diluir 7,5  $\mu$ L de los anticuerpos con 15,3  $\mu$ L de agua de grado LC-MS, luego desnaturalizar utilizando 6  $\mu$ L de surfactante al 5% apto para enzimas y MS a 90 °C durante 3 min.
1. Enfriar por 3min, etiquetar los N-glicanos escindidos agregando 12  $\mu$ L de reactivo de marcado fluorescente disuelto en anhídrido dimetilformamida (DMF) y esperar 5 min.
2. Colocar una placa de cromatografía de interacción hidrófila (HILIC) en un colector vacío.
3. Acondicionar los pozos con 200  $\mu$ L de agua, donde se ajusta el vacío para que el líquido tarde 15-30 s en pasar a través de la resina.
4. Eludir los N-glicanos marcados con tampón de elución SPE (3 eluciones de 30  $\mu$ L cada una) en los tubos de recogida, pipetear las muestras en viales de muestreador automático para prepararse para el análisis de fluorescencia (FLR)-MS.
5. Almacenar a -80 °C durante al menos 1 mes. Guardar la placa HILIC dentro de un desecador para su posterior uso (Velugula-Yellela et al., 2019)

**Anexo 10.** Criterios de selección de parámetros de producción de anticuerpos monoclonales

<b>Parámetros</b>								
<b>Artículo científico</b>	<b>Volumen</b>	<b>Tiempos</b>	<b>Rendimiento</b>	<b>Título</b>	<b>Densidad</b>	<b>Costos</b>	<b>Datos adicionales</b>	<b>Referencia</b>
Evaluación de costos de los procesos de producción de anticuerpos en diferentes modos de operación	Fed-Batch: 2000L	3 días en equipo multiuso y un día cuando en equipo de un solo uso. Después, se opera durante 14 días.	0,78 w/w	3g/L	Densidad celular $17,3 \cdot 10^6$ (6) ml y una densidad celular viable final de $10,7 \cdot 10^6$ (6) ml.	Coste de la mercancía para un cultivo feed batch: 59 €/gmAb	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Capacidad de producción anual: 200 kg/API</li> <li>• Tiempo de producción máxima anual: 333 d/a</li> </ul>	Klutz et al., 2016
Economía del proceso de fabricación industrial de anticuerpos monoclonales	Capacidad de producción biorreactor: 20000L	-	-	Cultivo de células de mamífero: 5g/L.	-	Costo anual por paciente puede alcanzar \$35,000 para anticuerpos que tratan afecciones de cáncer.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Producción a gran escala: 10–100 s kg/año.</li> <li>• Tasa de producción anual: 250kg/año</li> </ul>	Farid, 2007
Diseño integrado de procesos de fabricación biofarmacéutica: modos de operación y configuraciones de proceso para	Biorreactores feed batch: 2000L	La fermentación se desarrolló durante 14 días	-	-	El cultivo se sembró a partir de una solución de $0,32 \cdot 10^6$ células/ml.	-	Tasa de producción anual: 200Kg/año	Badr et al., 2021

---

la producción de anticuerpos monoclonales

---

Ingeniería celular y cultivo de células de ovario de hámster chino (CHO)	Biorreactor: 10000L	Tiempo de duplicación: 14-23h	-	5 g/L	Concentración de proteína sobrenadante 10-20 mg/L	-	-	Omasa et al., 2010
Alta densidad celular y alta producción de anticuerpos monoclonales a través de un diseño medio y control racional en un biorreactor	Biorreactor: 2L	Tiempo de producción total de mAbs: 549h	4,4g de mAbs	2400mg/L	Densidad celular máxima viable: $1,7 \times 10^7$ células/ml	-	Pesos de células secas de muestras tomadas a 453 y 549 h fueron 14,7 y 12,3 g/L	Wang, 1996

---

**Anexo 11.** Costo de equipos e insumos necesarios para la producción

<b>Concepto</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Costo unitario (\$)</b>	<b>Costo total (\$)</b>
Matraz de agitación (Mycap CCX Cell Culture)	1	1200,00	1200,00
Biorreactor de tanque agitado Sartorius 1 (8L)	1	4000,00	4000,00
Biorreactor de tanque agitado Sartorius 2 (50L)	1	25000,00	25000,00
Biorreactor de tanque agitado Sartorius 3 (400L)	1	45000,00	45000,00
Biorreactor de tanque agitado Sartorius 4 (2000L)	1	80000,00	80000,00
Botellas de vidrio cilíndricas	5	14,00	70,00
Botellas centrífugas	5	12,00	60,00
Centrifuga de mesa estándar (HETTICH UNIVERSAL)	1	5718,00	5718,00
Microscopio Invertido de Contraste de Fases 40X – 600X (AMSCOPE - USA)	1	3358,00	3358,00
Agitador orbital (modelo ISF-4-W)	1	1382,00	1382,00
Brand™ Cámaras de recuento Blaubrand™ Neubauer (Hemocitómetro)	1	180,84	180,84
Mini Bioreactor System (1000ml)	1	2500,00	2500,00
Espectrofotómetro UV-Vis	1	6510,05	6510,05
Tubos de centrifuga	10	15,88	158,80
Columna de proteína A	5	80,00	400,00
Resina Heparin HyperD® M	5	111,40	557,00
Embudo de vidrio de polipropileno	5	120,73	603,65
Embudo de separación	3	96,26	288,78
Soporte de columnas de cromatografía	1	150,00	150,00
Secador	1	3550,00	3550,00
Filtro de vacío rotativo	1	6500,00	6500,00
<b>Total (EPC)</b>			<b>180.687,12</b>

**Anexo 12.** Costo de reactivos bases empleados en el bioproceso

Componente	Unidad	Cantidad	Costo unitario (\$)	Costo total (\$)
Dihidrofolato reductasa ( <i>DHFR</i> Antibody (5B2))	uL	100	1,25	125,00
ProCHOTM 5 Protein-free CHO Medium	mL	1000	0,14	144,38
Solución roja de l-glutamina y fenol 50×.	mL	500	0,38	190,00
Solución HT de 50×.	mL	1000	0,05	53,40
Solución de azul tripano (0,4%).	mL	100	0,40	40,00
Trastuzumab (Herceptin)	mg	150	4,15	622,24
Thermo Scientific™ Tris	gr	1000	0,15	146,84
Invitrogen™ NaCl (5 M)	mL	500	0,36	180,00
Fosfato de sodio Thermo Scientific™	gr	1000	0,08	82,16
Dimethylformamide ( <i>DMF</i> )	mL	50	1,40	70,00
Tampón de elución de IgG Pierce™, pH 2,0	mL	1000	0,10	104,15
CD DG44 Medium	mL	1000	0,15	148,00
CHO DG44 Cells (Cgmp Banked)	cells/mL	106	1,32	140,00
PLURONIC F-68	mL	100	0,61	60,50
L-Glutamine 200mM	mL	100	2,81	281,45
<b>Total</b>				<b>2388,12</b>

**Anexo 13.** Costo de reactivos para la producción de 1,3kg de producto

Componente	Unidad	Cantidad	Costo unitario (\$)	Costo total (\$)
Dihidrofolato reductasa ( <i>DHFR</i> Antibody (5B2))	uL	10	1,25	12,50
ProCHOTM 5 Protein-free CHO Medium	mL	12	0,14	1,73
Solución roja de l-glutamina y fenol 50×.	mL	150	0,38	57,00
Solución HT de 50×.	mL	450	0,05	24,03
Solución de azul tripano (0,4%).	mL	2	0,40	0,80
Trastuzumab (Herceptin)	mg	4	4,15	16,59
Thermo Scientific™ Tris	gr	5	0,15	0,73



Invitrogen™ NaCl (5 M)	mL	10	0,36	3,60
Fosfato de sodio Thermo Scientific™	gr	5	0,08	0,41
Dimethylformamide ( <i>DMF</i> )	mL	12	1,40	16,80
Tampón de elución de IgG Pierce™, pH 2,0	mL	10	0,10	1,04
CD DG44 Medium	mL	100	0,15	14,80
CHO DG44 Cells (Cgmp Banked)	cells/mL	50	1,32	66,04
PLURONIC F-68	mL	10	0,61	6,05
L-Glutamine 200mM	mL	10	2,81	28,15
<b>Total</b>				<b>250,27</b>