

# UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de  
Doctora en Ciencias Biológicas

## **“Análisis de la inmunogenicidad de variantes O-glicosiladas del Inteferón alfa 2b y desarrollo de versiones con inmunogenicidad reducida”**

Lic. Sofía Inés Giorgetti

**Director de Tesis:** Dr. Eduardo F. Mufarrege

**Co-directora de Tesis:** Dra. Marina Etcheverrigaray

Centro Biotecnológico del Litoral - FBCB - UNL

**-2021-**

## AGRADECIMIENTOS

*“Del árbol en flor  
no sé más  
Solo su perfume”*

Matsuo Bashō

A la Universidad Nacional del Litoral y a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, por brindarme la formación profesional necesaria para realizar este trabajo, con educación de calidad, libre y gratuita.

A CONICET, por financiar mis estudios de doctorado durante estos años.

A los directivos y a todo el personal del Centro Biotecnológico del Litoral (CBL), que sostuvo el desarrollo de este proyecto y que constituyó el sustrato a partir del cual crecer, tanto en el ámbito profesional como personal.

A Eduardo Mufarrege, cuyo rol en el progreso de este trabajo y en mi formación me atrevo a calificar como imprescindible. Gracias por haber ejercido la dirección de este proyecto con enorme compromiso, paciencia y dedicación, y por la calidad humana y profesional con que me guiaste en cada instancia.

A Marina Etcheverrigaray, por haber confiado en mi para formar parte del equipo de trabajo, por estar siempre dispuesta a escuchar y comprometida con el avance del proyecto y con mi desarrollo profesional. Gracias por tu calidez y sostén.

Quiero agradecer también a todos mis compañeros y compañeras “de mesada”, partiendo de la certeza de la imposibilidad de *ser* sin otros y otras con quienes resonamos, nos complementamos, colaboramos y nutrimos, porque reafirmaron esta convicción con cada gesto. Muchas gracias a todo el personal de desarrollo de Zeltek y del CBL.

A Gustavo Orosco, por la paciencia, buena disposición y eficacia para llevar adelante el desarrollo de los cuantiosos procedimientos experimentales en animales. Gracias *Doc* por transformar esas horas de bioterio, que bien podrían haber figurado dentro los momentos más hostiles de mi trabajo, en ondulaciones del fuera del tiempo con tus innumerables anécdotas de niños puntanos, residentes de cirugía y otros tantos personajes.

A Anto, Soni, Fer, Luisi, Ile, Erne, Javi, Juani, Jesu, Lupe, Batta, Fran y Male quienes a través de su compartir cercano, sincero y amoroso hicieron de la oficina un precioso refugio. Uno con

paredes de piel y hueso, aroma a mate y borboteantes conversaciones capaces de aligerar los más espesos estados del aire. Estoy muy agradecida por haber podido crecer junto a ustedes.

A mis compañeras y compañeros de Revuelta y el Bachi, por ser quienes, desde la construcción amorosa y conjunta, me permitieron cuestionar mis privilegios y mi práctica profesional y darle perspectiva. Porque dudar no solo es importante para formular preguntas científicas, sino también como estrategia para la emancipación. *“Dudar como un acto de libertad y humildad intelectual. Dudar como quien sabe que no hay certezas ni verdades últimas, como quien gusta más de las preguntas incómodas que de las respuestas definitivas (...) Dudar como un modo de cuestionar lo-ya-pensado, lo-ya-sentido, lo-ya-aprendido, lo ya-hecho-cuerpo”* (Virginia Cano en *Borrador para un diccionario del desacato*). En definitiva, por demostrar/me que la salida es colectiva.

A mi familia, porque aún conscientes de las distancias ya sea físicas, ideológicas o sanitarias (pandemia mediante), supieron acompañar con ternura, paciencia y mucho, pero mucho, amor todo este proceso. Desde esas diferencias y semejanzas, y anclada en el profundo cariño que les tengo, les agradezco enormemente la compañía, el ánimo, el sostén.

A mis amigas y amigos, por las hermosas nuevas formas de afectación construidas en cada encuentro y en cada abrazo, que oxigenan el cuerpo y la mente y multiplican las esferas de lo posible. En estas ampliaciones de la vida, y en cada uno de los pliegues que se forman entremedio, encuentro la energía para seguir proyectando. Muchas gracias.♡

## PUBLICACIONES

La investigación que se describe a continuación, desarrollada en el marco de un trabajo de Tesis para optar al título de Doctora en Ciencias Biológicas, fue realizada en el Centro Biotecnológico del Litoral ubicado en la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe, Argentina).

**De-immunized and Functional Therapeutic (DeFT) versions of a longlasting recombinant alpha interferon for antiviral therapy.** Eduardo Mufarrege; [Sofía Giorgetti](#); Marina Etcheverrigaray; Frances Terry; William Martin; Anne DeGroot. Clin Immunol. 2017; 176:31-41. doi:10.1016/j.clim.2017.01.003.

Los resultados estrechamente relacionados con este trabajo de tesis no se han publicado hasta la fecha, dado que han sido protegidos para su registro a través de Solicitudes de patentes de invención (ver Otros aspectos Científicos-Tecnológicos).

### **Otros aspectos Científicos-Tecnológicos**

1) Presentación de solicitud de patente de invención el 17 de diciembre de 2019 en el Instituto Nacional de la Propiedad Industrial (INPI) en Argentina, bajo el título: **Interferón hiperglicosilado con inmunogenicidad reducida** (Nº de trámite web 830180, Acta 20190103715).

2) Presentación de solicitud de patente el 16 de diciembre de 2020 en el marco del sistema internacional de patentes, mediante el Tratado de Cooperación en materia de Patentes (PCT), bajo el título **Modified interferon-alpha-2 having reduced immunogenicity** (Nº de trámite de la aplicación: PCT/US2020/065246).

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>I</b>
<b>PUBLICACIONES</b>	<b>III</b>
<b>ÍNDICE</b>	<b>IV</b>
<b>ABREVIATURAS Y SIMBOLOS</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>10</b>
1. INTERFERONES: MEDIADORES MOLECULARES ESENCIALES DEL SISTEMA INMUNE	11
1.1. Clasificación y nomenclatura de los interferones	11
2. INTERFERONES HUMANOS (hIFNs) DE TIPO I	12
2.1. Síntesis de los hIFNs de tipo I	12
2.2. Funciones de los hIFNs de tipo I	13
3. IFN- $\alpha$ HUMANO (hIFN- $\alpha$ )	16
3.1. Estructura molecular del hIFN- $\alpha$ 2	17
3.2. hIFN- $\alpha$ 2 como proteína terapéutica	18
3.2.1. Estrategias de mejoramiento del rhIFN- $\alpha$ 2b como agente terapéutico	19
4. INMUNOGENICIDAD DEL rhIFN- $\alpha$	21
4.1. Generación de ADAs	22
4.2. Células dendríticas, protagonistas esenciales en el desarrollo de la respuesta humoral	23
4.3. Activación de linfocitos T-CD4+ vírgenes	27
4.4. Activación Td de linfocitos B y producción de ADAs	30
5. ESTRATEGIAS DE ANÁLISIS DE LA INMUNOGENICIDAD POTENCIAL DE LAS PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS	31
5.1. Métodos de predicción de la inmunogenicidad <i>in silico</i> mediante algoritmos computacionales	32
5.2. Validación experimental: ensayos <i>in vitro</i> y <i>ex vivo</i>	33
5.3. Ensayos <i>in vivo</i>	35
6. ¿PORQUÉ hIFN- $\alpha$ 2 COMO TERAPIA ANTIVIRAL? ENFERMEDADES VIRALES EMERGENTES: ARBOVIRUS	37
<b>OBJETIVOS</b>	<b>41</b>
1. OBJETIVO GENERAL	42
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>44</b>
1. DESARROLLO DE VARIANTES DE-INMUNIZADAS DE GMOP-IFN MEDIANTE ALGORITMOS DE PREDICCIÓN <i>IN SILICO</i>	45
2. REACTIVOS Y SOLUCIONES	46
3. LÍNEAS CELULARES	46
4. MEDIOS DE CULTIVO	46

4.1.	Medios de cultivo para células eucariotas	46
4.2.	Medios de cultivo para células procariotas	47
5.	TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	48
5.1.	Digestiones enzimáticas	48
5.2.	Electroforesis en geles de agarosa	48
5.3.	Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa	49
5.4.	Purificación mediante precipitación de los fragmentos de ADN digeridos por endonucleasas	49
5.5.	Reacciones de ligación de ADN	50
5.6.	Preparación de células competentes	50
5.7.	Transformación de células competentes	51
5.8.	Preparación de ADN plasmídico	51
5.8.1.	Minipreparación	51
5.8.2.	Maxipreparación	51
5.9.	Determinación de la concentración y pureza del ADN	53
5.10.	Construcción de los plásmidos pLV-PLK conteniendo las variantes de GMOP-IFN	53
5.11.	Criopreservación de células bacterianas	56
5.12.	Revitalización de cepas bacterianas	56
6.	TÉCNICAS DE CULTIVO DE CÉLULAS ANIMALES	56
6.1.	Condiciones de cultivo de células eucariotas	56
6.1.1.	Cultivo de células adherentes	56
6.1.2.	Cultivo de células en suspensión	57
6.2.	Determinación de la concentración celular	57
6.3.	Criopreservación de líneas celulares animales	58
6.4.	Descongelamiento de líneas celulares animales	59
6.5.	Generación de las líneas celulares productoras de las variantes de GMOP-IFN	59
6.5.1.	Producción de partículas lentivirales mediante transfección de células HEK-293T/17	59
6.5.2.	Transducción de células CHO-K1	62
6.6.	Presión de selección con antibiótico de las líneas celulares productoras de las variantes de GMOP-IFN	62
7.	PRODUCCIÓN DE LAS VARIANTES DE GMOP-IFN	63
7.1.	Cuantificación de las variantes de GMOP-IFN en sobrenadantes de cultivo mediante ELISA sándwich	63
7.2.	Identificación de las variantes de GMOP-IFN $\alpha$ 2b en sobrenadantes de cultivo mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) seguido de <i>western blot</i>	65
8.	PURIFICACIÓN DE LAS DIFERENTES VARIANTES DE GMOP-IFN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE INMUNOAFINIDAD	66
8.1.	Equipamiento	67
8.2.	Preparación de la matriz de inmunoafinidad CA5E6-Sepharose	67
8.2.1.	Purificación del mAb CA5E6	67
8.2.2.	Determinación de la concentración y pureza del mAb purificado	68
8.2.3.	Acoplamiento del mAb a la matriz de sepharose	69
8.3.	Cromatografía de inmunoafinidad empleando la resina CA5E6-Sepharose	70

8.4.	Concentración y diafiltración de las variantes de GMOP-IFN	71
8.5.	Evaluación de la concentración y pureza de las variantes de GMOP-IFN	71
9.	CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL Y ANALÍTICA DE LAS VARIANTES DE-INMUNIZADAS DE GMOP-IFN	72
9.1.	Valoración de la actividad biológica <i>in vitro</i> de las variantes de GMOP-IFN	72
9.1.1.	Actividad biológica antiviral	72
9.1.2.	Actividad biológica antiproliferativa	74
9.2.	Predicción de la probabilidad de <i>O</i> -glicosilación	75
9.3.	Análisis del perfil de glicofomas de las variantes de-inmunizadas de GMOP-IFN por medio de isoelectroenfoque	75
10.	EVALUACIÓN FARMACOCINÉTICA DE LAS VARIANTES FUNCIONALES DE GMOP-IFN	76
10.1.	Metodología Experimental	76
10.2.	Estimación de parámetros farmacocinéticos	77
10.3.	Estimación de parámetros farmacocinéticos mediante el método de los residuales	80
11.	EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD <i>EX VIVO</i> DE GMOP-IFN Y SUS VARIANTES DE-INMUNIZADAS.	81
11.1.	Purificación de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humana	81
11.2.	Tipificación de los alelos HLA-DRB1 de las muestras de sangre	82
11.3.	Descongelamiento de las CMSP criopreservadas	82
11.4.	Ensayo de activación <i>in vitro</i> de linfocitos T	82
11.4.1.	Obtención de monocitos a partir de CMSP	83
11.4.2.	Diferenciación de monocitos a células dendríticas inmaduras	83
11.4.3.	Maduración de células dendríticas	84
11.4.4.	Incubación de las células dendríticas maduras con los linfocitos T autólogos	84
11.5.	Cuantificación de IFN- $\gamma$ en sobrenadantes de cultivo por medio de ELISA sándwich	85
11.6.	Índices de estimulación	86
11.7.	Evaluación de la restricción de HLA-DR	87
12.	12. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE <i>IN VIVO</i>	87
12.1.	Cuantificación de anticuerpos totales $\bar{\alpha}$ -hIFN- $\alpha$ 2b en plasma de ratones inmunizados con las distintas variantes de GMOP-IFN mediante ELISA indirecto	88
12.2.	Evaluación del título de anticuerpos neutralizantes contra las distintas variantes de GMOP-IFN en plasma de ratones por medio de ensayos de inhibición de la ABAV	89
	<b>RESULTADOS</b>	<b>91</b>
1.	DISEÑO DE VARIANTES DE-INMUNIZADAS DE GMOP-IFN MEDIANTE ALGORITMOS DE PREDICCIÓN <i>IN SILICO</i>	92
2.	GENERACIÓN DE LAS VARIANTES DE-INMUNIZADAS DE GMOP-IFN	96
2.1.	Construcción de los plásmidos pLV-PLK conteniendo las diferentes variantes de GMOP-IFN	96

2.2.	Generación de líneas celulares productoras de las variantes de-inmunizadas de GMOP-IFN	98
3.	PURIFICACIÓN DE LAS VARIANTES DE GMOP-IFN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE INMUNOAFINIDAD	100
3.1.	Preparación de la matriz de inmunofinidad CA5E6-Sepharose: purificación del mAb anti-hIFN- $\alpha$ 2b CA5E6 y acoplamiento a la matriz de <i>Sepharose</i>	100
3.2.	Cromatografía de inmunofinidad empleando la resina CA5E6-Sepharose	101
4.	CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL Y ANALÍTICA DE LAS VARIANTES DE-INMUNIZADAS DE GMOP-IFN	107
4.1.	Valoración de la actividad biológica <i>in vitro</i> de las variantes de GMOP-IFN	107
4.2.	Análisis del perfil de glicofomas de las variantes de-inmunizadas de GMOP-IFN por medio de IEF	109
5.	EVALUACIÓN DEL PERFIL FARMACOCINÉTICO DE LAS VARIANTES GMOP-IFN-VAR2 y GMOP-IFN-VAR3	110
6.	EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD <i>EX VIVO</i> DE GMOP-IFN Y SUS VERSIONES DE-INMUNIZADAS	112
6.1.	Tipificación de los alelos HLA-DRB1 en muestras de sangre	113
6.2.	Evaluación de la activación de linfocitos T-CD4 <sup>+</sup> a partir de su incubación con las distintas variantes de GMOP-IFN	114
7.	EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE <i>IN VIVO</i> DE GMOP-IFN Y DE SUS VERSIONES DE-INMUNIZADAS	117
7.1.	Evaluación del título de anticuerpos $\bar{\alpha}$ -hIFN- $\alpha$ 2b en plasma de ratones inmunizados con las distintas versiones de GMOP-IFN	117
	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>119</b>
1.	DESARROLLO DE VARIANTES DE-INMUNIZADAS: DE LA PREDICCIÓN AL DISEÑO	121
2.	PRODUCCION Y CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE-INMUNIZADAS	123
3.	CONTENIDO DE O-GLICANOS Y SU INFLUENCIA EN LA ACTIVIDAD <i>IN VIVO</i> DE LAS VARIANTES DE-INMUNIZADAS DE GMOP-IFN	125
4.	EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE LAS VARIANTES DE-INMUNIZADAS DE GMOP-IFN	128
4.1.	Activación <i>ex vivo</i> de linfocitos T antígeno-específicos en muestras de CMSP humana	128
4.2.	Interpretación de los resultados del análisis de la inmunogenicidad <i>in vivo</i> : modelos de animales transgénicos	129
	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>132</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>138</b>



## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

A	absorbancia
AB	actividad biológica
ABAC	Asociación Banco Argentino de Células
ABE	actividad biológica específica
ADA	anticuerpos específicos contra la droga
ADAR	adenosin desaminasa específica de ARN
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNdc	ADN doble cadena
ANOVA	análisis de la varianza
ARN	ácido ribonucleico
ARNasa	endorribonucleasa
ARNasa L	endorribonucleasa latente
ATCC	American Type Culture Collection
AUC	área bajo la curva
BCR	receptor de superficie de linfocitos B
BSA	seroalbúmina bovina
C	concentración de IFN
C <sub>an</sub>	concentración de ácido nucleico
CDc	células dendríticas convencionales
CDK-2	quinasa dependiente de ciclina
CDp	células dendríticas plasmocitoides
Cél.	células
CHIKV	Virus chikungunya
CHO	línea celular de hámster chino establecida a partir de ovario
CLapp	<i>clearance</i> aparente
C <sub>mAb</sub>	concentración de anticuerpo monoclonal
C <sub>máx</sub>	concentración plasmática máxima de la droga luego de su administración
CMH	complejo mayor de histocompatibilidad
CMH-I	complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I
CMH-II	complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II
CMSP	células mononucleares de sangre periférica
CMV	citomegalovirus

CNBr	bromuro de cianógeno
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
col.	colaboradores
C <sub>p</sub>	concentración plasmática de la droga
C <sub>p</sub> <sup>t</sup>	concentración plasmática de la droga a un tiempo tardío desde su inyección
CPAs	células presentadoras de antígeno profesionales
DO	dosis de droga administrada
DB	cantidad de droga en el cuerpo
DENV	Virus del Dengue
DGI	cantidad de droga en el tracto gastrointestinal
D-MEM	medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	dimetilsulfóxido
dNTPs	desoxinucleótidos
DO	densidad óptica
Dol-P	lípidico dolicol fosfato
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EA	enfermedad autoinmune
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético
eIF2	factor de iniciación de la transcripción
ELISA	enzimoinmunoensayo
EMA	European Medicines Agency
F	fracción de fármaco absorbida
Fc	fragmento constante de las inmunoglobulinas
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FT	<i>flowthrough</i>
Fw	en sentido directo
GalNAc	N-acetilgalactosamina
GalNAc-Ts	N-acetilgalactosamina transferasas
gag	proteína de la cápside lentiviral
Ham's F12	fórmula 12 de Ham
HBV	virus de la hepatitis B
HCV	virus de la hepatitis C
HEK293	línea celular humana establecida a partir de riñón
hGM-CSF	factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humano

hIFN	interferón humano
hIFN- $\gamma$	interferón gamma humano
hIL-4	interleuquina 4 humana
HIV	virus de la inmunodeficiencia humana
HLA	moléculas humanas del CMH (del inglés <i>Human Leukocyte Antigen</i> )
IEF	isoelectroenfoque
IFN	interferón
IFN-4N	hIFN- $\alpha$ 2b hiperglicosilado, con cuatro sitios potenciales de N-glicosilación
IFNAR	receptores de interferón
IFNAR-1	receptor de interferón-subunidad 1
IFNAR-2	receptor de interferón-subunidad 2
Ig	inmunoglobulina
IL	interleuquina
IRFs	factores regulatorios de interferón
ISGF3	factor 3 de los genes estimulados por interferon
ISGs	genes estimulados por interferón
ISREs	elementos de respuesta estimulados por interferón
JAK-1	quinasa de Janus 1
$k_a$	constante de velocidad de absorción de primer orden
$k_e$	constante de eliminación de primer orden
L	longitud del camino óptico
LB	medio de cultivo Luria-Bertani
LCC	Laboratorio de Cultivos Celulares
LTRs	repeticiones terminales largas
LV	lentivirus
m/z	relación masa/carga
mAb	anticuerpo monoclonal
MAPKs	proteínas quinasas activadas por mitógenos
MDBK	línea de células bovinas Madin-Darbin derivada de riñón
MEM	medio esencial mínimo
mIFN- $\gamma$	interferón gamma de ratón
mIL-4	interleuquina 4 de ratón
MM	masa molecular
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxi-fenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolium)

Mx	proteína de resistencia a myxovirus
N <sub>2</sub>	nitrógeno
Neu5Ac	ácido acetilneuramínico
Neu5Gc	ácido glicolilneuramínico
NIBSC	<i>National Institute for Biological Standards and Control</i>
NK	células <i>natural killer</i>
NLR	receptores de tipo NOD
OAS	2'-5'-oligoadenilato sintetasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPD	o-fenilendiamina
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PAMPs	patrones moleculares asociados a patógenos
pb	pares de bases
PBS	solución salina de fosfatos
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEG	polietilenglicol
pI	punto isoeléctrico
PI3K	fosfatidilinositol 3-quinasa
PKR	proteína quinasa R
PMS	metasulfato de fenazina
pol	proteína polimerasa lentiviral
PRR	receptores de reconocimiento de patrones
PVDF	difluoruro de polivinilo
R	recuperación
RE	retículo endoplasmático
Rev	proteína lentiviral Rev
rhFVIIa	factor VII activado recombinante humano
rhGM-CSF	factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humano recombinante
rhIFN	interferón humano recombinante
rhIL-4	interleuquina 4 humana recombinante
RLR	receptores de tipo RIG-I
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
Rv	en sentido reverso
SD	desviación estándar

SDS	dodecilsulfato de sodio
SFB	suero fetal bovino
SN	sobrenadante de cultivo
STAT	transductor de señales y activador de la transcripción
SV40	virus símico 40
t	tiempo
$t_{1/2elim}$	tiempo de vida media terminal
TAE	solución de Tris-acetato-EDTA
TBS	solución de Tris
TCR	receptor de superficie de los linfocitos T
Td	dependiente de lindofcitos T
TE	solución de Tris-EDTA
Ti	independiente de lindofcitos T
TLR	receptor de tipo Toll
$T_{máx}$	tiempo para alcanzar la $C_{máx}$
TNF	factor de necrosis tumoral
TNFR	receptor del factor de necrosis tumoral
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminoetano
Tween 20	polisorbato 20
TYK2	quinasa 2 dependiente de tirosina
VC	volúmenes de columna
VD	volumen de distribución de la droga
VEGF	factor de crecimiento del endotelio vascular
VSV	virus de la estomatitis vesicular
WT	<i>wild type</i>
X	concentración de células
XM	concentración de células muertas
XT	concentración de células totales
XV	concentración de células viables
ZIKV	virus del Zika
$\lambda$	longitud de onda

## RESUMEN

El interferón alfa 2 humano recombinante (rhIFN- $\alpha$ 2), primer agente antiviral aprobado para el tratamiento de hepatitis B y C crónicas, es una citoquina de bajo peso molecular de corta vida media en circulación. Se considera que su reducido tiempo de residencia en plasma es el principal factor responsable del fracaso de la terapia con el rhIFN- $\alpha$ 2 producido en bacterias, debido a los efectos colaterales tóxicos asociados a las elevadas dosis y frecuencia de administración necesarias, que causan un deterioro significativo en la calidad de vida de los pacientes. Por este motivo, numerosos estudios se han enfocado en el desarrollo de formulaciones de rhIFN- $\alpha$ 2 de acción prolongada, con perfiles farmacocinéticos mejorados, que posibiliten sostener la supresión viral durante mayores intervalos de tiempo.

En este sentido, en nuestro laboratorio se han diseñado diferentes variantes del rhIFN- $\alpha$ 2b a partir de su fusión a etiquetas peptídicas con diverso número de sitios potenciales de O-glicosilación. Una de estas variantes fue generada mediante la fusión de una etiqueta de 14 aminoácidos, denominada GMOP, derivada de la región N-terminal del GM-CSF humano, que presenta 4 sitios potenciales de O-glicosilación. La proteína resultante, GMOP-IFN, presenta características mejoradas con respecto a la citoquina original en cuanto al perfil farmacocinético y la actividad biológica, lo cual la posiciona como un candidato terapéutico muy promisorio en la industria farmacéutica.

No obstante, tratamientos prolongados con hIFN- $\alpha$ 2 pueden dar lugar a un quiebre de la tolerancia inmunológica frente a antígenos propios, con la consiguiente producción de anticuerpos anti-IFN. Al unirse a la citoquina, estos anticuerpos pueden provocar una alteración en la farmacocinética de la misma o incluso inhibir su acción terapéutica. Por este motivo, el objetivo del presente trabajo se centró en el análisis de la inmunogenicidad de GMOP-IFN y en el desarrollo de nuevas variantes con inmunogenicidad reducida, sin producir un impacto negativo en su estructura y función biológica, apuntando a diseñar un candidato terapéutico mejorado en cuanto a su antigenicidad/inmunogenicidad, sobre la base de sus parámetros farmacocinéticos y actividad biológica *in vitro*.

Por medio de la aplicación del método DeFT (del inglés, *De-immunization of Functional Therapeutics*) se llevó a cabo un procedimiento de de-inmunización, empleando herramientas de predicción *in silico* que permitieron identificar las regiones potencialmente inmunogénicas en la secuencia de GMOP-IFN, así como los cambios puntuales que conducirían a la reducción de su inmunogenicidad global, evitando alterar la estructura y función de la proteína. Estas modificaciones fueron introducidas en distintas combinaciones generando cuatro variantes de-

inmunizadas, dos de las cuales conservaron gran porcentaje de la actividad antiviral original. Además, estas variantes presentaron nula actividad antiproliferativa, lo cual representa una gran ventaja desde el punto de vista de los efectos adversos del medicamento como agente antiviral. Asimismo, las variantes desarrolladas mantuvieron intactos los parámetros farmacocinéticos mejorados que presenta la molécula GMOP-IFN con respecto a la citoquina comercial. Por último, ambas muteínas exhibieron una inmunogenicidad *ex vivo* e *in vivo* inferior a la de la molécula original.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que las variantes de-inmunizadas de GMOP-IFN desarrolladas presentan características únicas desde el punto de vista de su inmunogenicidad, actividad biológica y perfil farmacocinético, lo cual las posiciona como candidatos terapéuticos muy promisorios para el tratamiento de infecciones virales humanas.

## ABSTRACT

Recombinant human interferon alpha 2 (rhIFN- $\alpha$ 2), the first antiviral agent approved for the treatment of chronic hepatitis B and C, is a low molecular weight cytokine with an extremely short plasma half-life. Its reduced residence time in serum is considered as the main factor responsible for the failure of the therapy with rhIFN- $\alpha$ 2 produced in bacteria, due to the toxic collateral effects associated with high dosages and frequency of administration, which significantly deteriorate patient's life quality. For this reason, numerous studies have focused on the development of long-acting rhIFN- $\alpha$ 2 formulations, with improved pharmacokinetic profiles that enable the achievement of adequate viral suppression rates.

In this scenario, in our laboratory different variants of rhIFN- $\alpha$ 2b have been designed by fusing the cytokine sequence to different O-glycosylated peptide tags. One of these tags, referred to as GMOP, is derived from the N-terminal region of the human GM-CSF and consists of a 14 amino acid peptide with 4 potential O-glycosylation sites. The resulting fusion protein, GMOP-IFN, has shown improved characteristics with respect to the original cytokine in terms of pharmacokinetic profile and biological activity, which highlight it as a very promising therapeutic candidate in the pharmaceutical industry.

However, prolonged treatments involving frequent and high dose administrations of rhIFN- $\alpha$ 2 may lead to breaking of immune tolerance to self-antigens, which results in the generation of anti-IFN antibodies. These antibodies could neutralize the therapeutic effect of the cytokine by blocking its receptor's binding site, or partially reducing its action by accelerating the protein's clearance mechanisms. For this reason, in this study we focused on the analysis of GMOP-IFN immunogenicity and the development of new therapeutic candidates with reduced antigenicity/immunogenicity, without affecting its structure and biological function, and with improved pharmacokinetic parameters and *in vitro* biological activity.

A de-immunization procedure was carried out through the application of the DeFT (De-immunization of Functional Therapeutics) approach to develop functional, de-immunized versions of GMOP-IFN. *In silico* prediction tools allowed the identification of potentially immunogenic regions in the GMOP-IFN sequence, as well as those point mutations that could lead to a reduction in the overall immunogenicity, which were then integrated into four de-immunized variants, in different combinations. Two of these GMOP-IFN variants preserved the original antiviral function. Moreover, both IFN analogs showed null antiproliferative activity, which constitutes an additional favorable characteristic when considering the dramatic



hematologic disorders commonly associated with this rhIFN- $\alpha$  biological function. Moreover, pharmacokinetic parameters for both variants were similar to those of GMOP-IFN.

Finally, both muteins exhibited reduced *ex vivo* and *in vivo* immunogenicity when compared to the original molecule.

Altogether the results presented in this study indicate that the new de-immunized GMOP-IFN variants constitute promising candidates for antiviral therapy, exhibiting reduced immunogenicity, proven *in vitro* antiviral activity and improved pharmacokinetic profile, while lacking antiproliferative activity.

# »» INTRODUCCIÓN

## **1. INTERFERONES: MEDIADORES MOLECULARES ESENCIALES DEL SISTEMA INMUNE**

Los interferones (IFNs) son una familia de citoquinas específicas de especie, secretadas de forma autócrina y parácrina por las células huésped en respuesta a patógenos, fundamentalmente virus, y productos microbianos como endotoxinas, piranos y polirribonucleótidos de doble cadena, entre otras. Generalmente, están compuestos por cadenas aminoácidas de 130 a 170 aminoácidos, con un peso molecular variable entre 20 y 100kD. Al igual que la mayoría de las proteínas, son sensibles a enzimas proteolíticas y al calor, aunque relativamente estables a valores bajos de pH [1]. Esencialmente, la función de los IFNs consiste en aumentar la transcripción de cientos de genes estimulados por IFN (ISGs, del inglés *Interferón-Stimulated Genes*) cuyos productos cumplen un rol primordial en la respuesta inmune innata y adaptativa frente a infecciones virales, produciendo además profundos cambios metabólicos [2].

La transcripción de los genes que codifican para los distintos tipos de IFNs en la célula huésped, que normalmente se encuentra silenciada, es inducida en respuesta a infecciones por medio de la unión de diferentes factores de transcripción a sus promotores. Luego de su unión al receptor de alta afinidad, localizado en el exterior de las superficies celulares, este grupo de proteínas desempeña importantes funciones en la comunicación intercelular, estimulando vías de señalización intracelulares e intercelulares involucradas en la resistencia a infecciones virales, el desarrollo de la respuesta inmune innata y adaptativa y la modulación del crecimiento, la diferenciación celular y la apoptosis [3]. Debido a su potente función como agentes antivirales, diversos tipos de IFNs se han usado en la clínica para el tratamiento de enfermedades virales, fundamentalmente contra los virus de la Hepatitis B (HBV) y la Hepatitis C (HCV).

### **1.1. Clasificación y nomenclatura de los interferones**

Los IFNs se clasifican en IFNs de tipo I, II y III según los receptores celulares a los que se unen. Estos receptores se encuentran estrechamente relacionados estructural y funcionalmente. Están compuestos por cadenas pertenecientes a la familia de clase II de receptores de citoquinas helicoidales, definida por la estructura de los dominios extracelulares de sus miembros. Ejercen su función exclusivamente como heterodímeros en la vía clásica de transducción de señales y ninguna subunidad puede transducir la señal individualmente [4].

Los IFNs de tipo I comprenden al IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  e IFN- $\omega$ , que median en forma directa una poderosa acción antiviral, y otros menos estudiados como IFN- $\tau$ , - $\delta$ , - $\kappa$  y - $\epsilon$ , de los cuales sólo los dos últimos fueron encontrados en humanos hasta el momento. El IFN de tipo II, también denominado IFN- $\gamma$ , fue reportado por primera vez en 1965 [5] y se destaca por su capacidad para modular la respuesta inmunitaria, tanto innata como adaptativa, y por inducir la activación de macrófagos. Es producido principalmente por células del sistema inmune (linfocitos T activados, células *natural killer* (NK) y macrófagos) y, a diferencia del resto de los IFNs, su acción es mediada a través de la formación de un homodímero. Los IFNs de tipo III fueron identificados en el año 2003 por dos laboratorios de forma independiente y se componen por IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\lambda$ 2 e IFN- $\lambda$ 3 [6] (o IL-28A, IL-28B e IL-29, respectivamente [7]) y el recientemente descrito IFN- $\lambda$ 4 [8]. Los IFNs de tipo III activan las mismas vías de señalización y respuestas transcripcionales que los interferones de tipo I, pero han desarrollado afinidad hacia a un receptor de estructura completamente diferente. Pese a que el repertorio de genes inducidos por ambos tipos de IFNs es similar, presentan distintas cinéticas de inducción, dando lugar a efectos divergentes. Por otro lado, los IFNs de tipo III presentan un tropismo único, restringiendo sus vías de señalización y funciones mayormente a células epiteliales. En efecto, se ha descubierto que los IFN- $\lambda$  cumplen un rol fundamental en la inmunidad de mucosas [9].

## **2. INTERFERONES HUMANOS (hIFNS) DE TIPO I**

La familia de los hIFNs de tipo I está compuesta por múltiples genes, que incluyen 17 variantes no alélicas, todas localizadas en el cromosoma 9. En humanos existen 13 genes funcionales de IFN- $\alpha$  (14 en ratones) que dan lugar a 12 proteínas de hIFN- $\alpha$  diferentes: hIFN- $\alpha$ 1, -2, -4, -5, -6, -7, -8, -10, -14, -16, -17 y -21 [10] con un 80% de homología en su estructura primaria, mientras que se ha identificado un solo tipo de los restantes miembros de esta familia hIFN- $\beta$ , hIFN- $\epsilon$ , hIFN- $\kappa$  y hIFN- $\omega$ , con menor homología de secuencia (30-50%) [11].

Todos los interferones humanos (hIFNs) de tipo I se unen al mismo complejo receptor de superficie, denominado IFNAR, compuesto por dos subunidades: IFNAR-1 e IFNAR-2, ubicuamente expresadas en la mayoría de los tejidos y tipos celulares. La formación del complejo receptor involucra la interacción de una parte del IFN con una región específica del IFNAR-2, conformando la bisagra para la unión de los dominios extracelulares de ambas subunidades [12].

### **2.1. Síntesis de los hIFNs de tipo I**

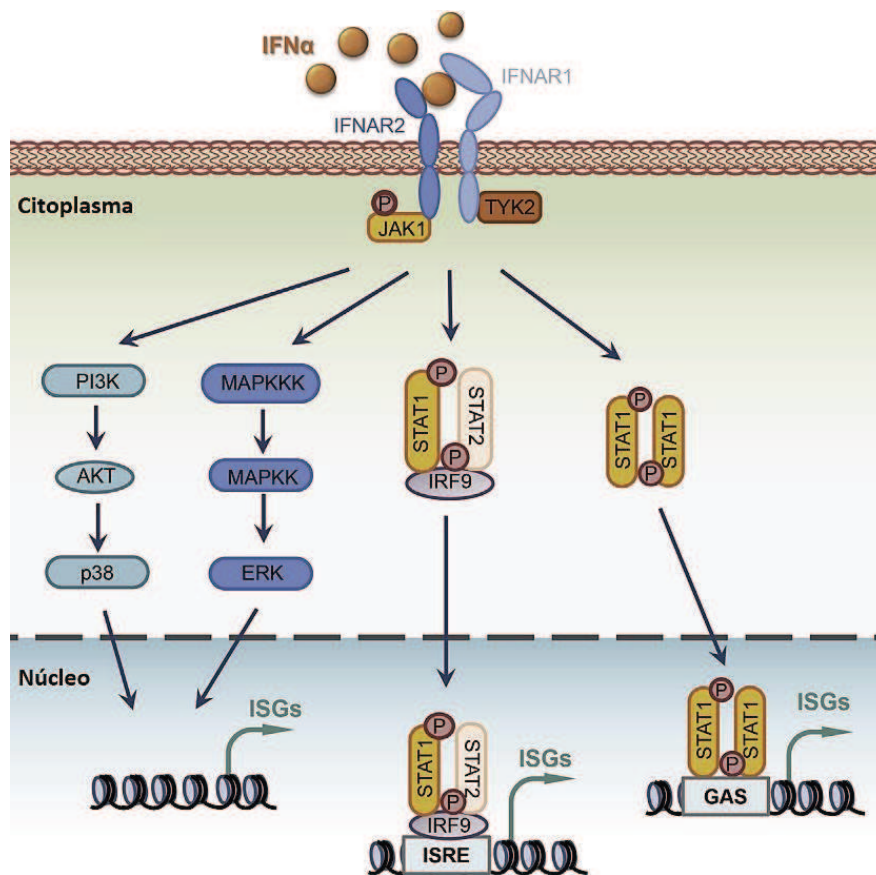
La producción de hIFNs de tipo I puede ser inducida, dependiendo del tipo de estímulo, en un amplio rango de tipos celulares, siendo las células dendríticas plasmocitoides la mayor fuente de IFNs de tipo I. En el contexto de una infección viral, el primer paso para dar lugar a una respuesta inmunitaria consiste en el reconocimiento de componentes virales o patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) por células de la inmunidad innata, mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Este reconocimiento activa la familia de factores de transcripción del factor regulador de interferón (IRF). La producción de hIFNs de tipo I es transitoria, y requiere de una estimulación, por lo general por parte de los ácidos nucleicos víricos, que son reconocidos en el citosol celular o en el compartimento endosómico. Éstos se unen a distintos tipos de PRR intracelulares pertenecientes a distintas familias de receptores: de tipo Toll (TLR), de tipo RIG-I (RLR) y de tipo NOD (NLR). La interacción entre un determinado PRR y su ligando conduce al reclutamiento de proteínas quinasas específicas encargadas de fosforilar y activar determinados factores de transcripción. Estos factores, una vez fosforilados, se trasladan al núcleo celular e interaccionan con factores de transcripción específicos para promover inicialmente la transcripción de hIFN- $\beta$  y posteriormente la transcripción de varios subtipos de hIFN- $\alpha$  [13,14].

## **2.2. Funciones de los hIFNs de tipo I**

La función de los hIFN de tipo I se desencadena a partir de una serie de cascadas de señalización intracelulares que gatillan múltiples funciones inmunológicas, afectando distintos procesos celulares como la proliferación, diferenciación, activación, migración y apoptosis, entre otros.

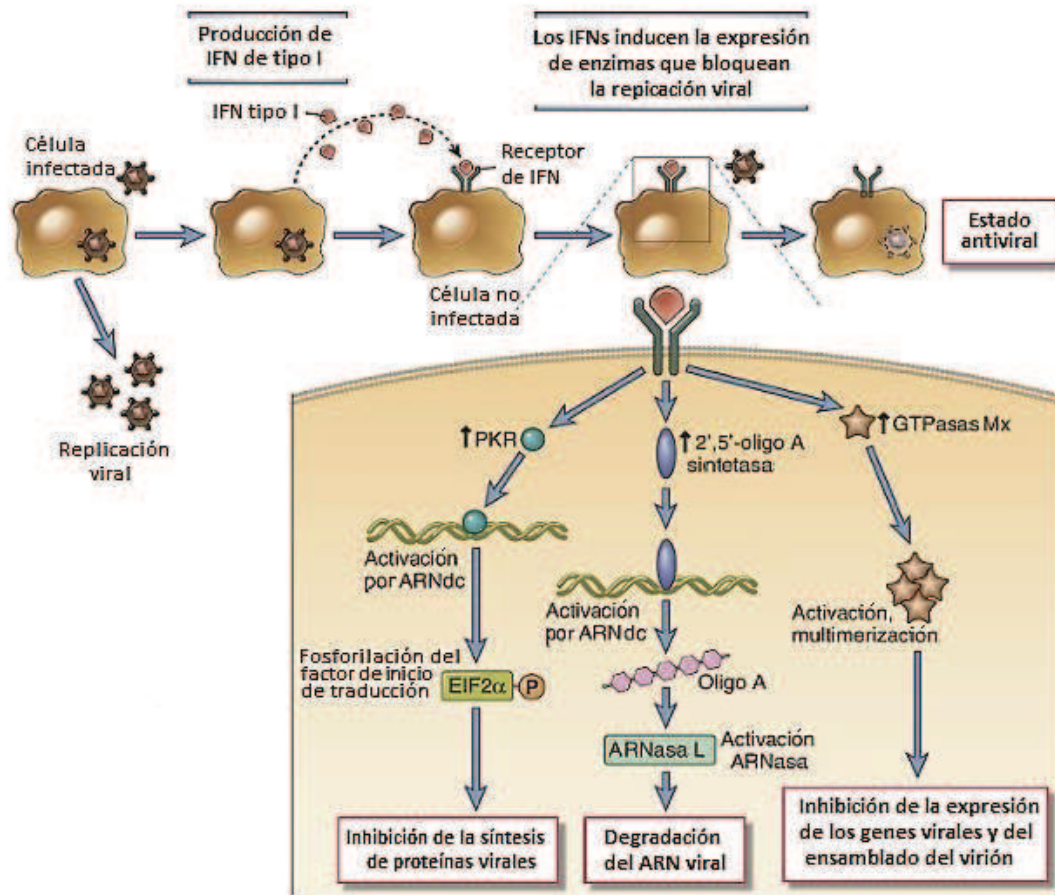
En la vía canónica de señalización, conocida como vía JAK-STAT (vía de la quinasa de Janus, JAK, y el transductor de señales y activador de la transcripción, STAT) la unión del hIFN de tipo I desencadena la dimerización del complejo receptor heterodimérico IFNAR, lo que promueve la fosforilación de las quinasas de la familia de Janus JAK1 y TYK2, activándolas. Luego, JAK1 y TYK2 reclutan y activan a las proteínas STAT1 y STAT2, lo cual resulta en su dimerización y reclutamiento del factor de regulación de IFN  $\gamma$  (IRF9). Estas tres proteínas forman el complejo ternario ISGF3, capaz de translocar al núcleo celular donde se unen a elementos de respuesta estimulados por IFN (ISREs) del ADN y median la expresión de diferentes genes estimulados por IFN (ISGs), involucrados en el desarrollo de respuestas antivirales, proinflamatorias e inmunomoduladoras (Figura 1). Adicionalmente, por medio de la vía no canónica de señalización, la unión de los hIFN de tipo I es capaz de inducir la expresión de los ISGs a partir

de la activación de otras proteínas STAT (como STAT 3, 5 y 6) o mediante la vía de las quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) o la vía del fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K; Figura 1) [15].



**Figura. 1.** Señalización mediada por IFN a través de las vías canónica y no canónica. En la vía de señalización canónica, luego de la unión de los IFNs, el receptor IFNAR fosforila y activa JAK1 y TYK2, los cuales reclutan y activan las proteínas STAT, dando como resultado su dimerización o trimerización y posterior translocación al núcleo. Estos dos complejos transcripcionales regulan la expresión de diferentes conjuntos de ISGs. ISGF3, la forma trimérica formada por STAT1, STAT2 e IRF9, induce la expresión de genes de respuesta antiviral por medio del reconocimiento del motivo ISRE en el ADN. Por su parte, el complejo homodimérico formado por STAT1 es capaz de unirse al motivo GAS y activar la expresión de genes involucrados en la respuesta proinflamatoria. La vía de señalización no canónica también puede inducir la expresión de un grupo de genes independiente de las proteínas STATs, como las vías de MAPKs o PI3K. Figura modificada de Chen y col., 2017 [15].

Una de las funciones de los hIFNs de tipo I consiste en mediar la acción antiviral por medio de la inhibición del ciclo del virión, promoviendo la síntesis de enzimas que interfieran con el transporte de la partícula vírica, con la transcripción y replicación de su material genético o con la traducción del ARN viral (Figura 2).



**Figura 2.** Actividad antiviral mediada por interferones de tipo I. Los IFNs de tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ) son producidos por las células infectadas por virus en respuesta a señalizaciones intracelulares que ocurren a través de los RRP y otros sensores de ADN viral. Los IFNs de tipo I se unen a sus receptores de membrana presentes en células vecinas no infectadas, activando vías de señalización, las cuales inducen la expresión de ciertos genes cuyos productos interfieren con la replicación viral. PKR: Proteína quinasa dependiente de ARN bicatenario. Figura modificada de Abbas y col., 2015 [14].

Entre estas enzimas se encuentran:

- La proteína quinasa dependiente de ARN bicatenario (PKR) inducida por IFN- $(\alpha/\beta)$ , la cual provoca, entre otras acciones, la fosforilación e inactivación de la subunidad  $\alpha$  del factor de iniciación de la transcripción eIF2, promoviendo el bloqueo de la síntesis de proteínas e inhibición de la replicación viral [16].

- La 2'-5' oligoadenilatosintetasa (OAS) es otra enzima inducida por IFN- $(\alpha/\beta)$  y también activada por ARN bicatenario. Cuando se activa, cataliza la síntesis de 2'-5' oligoadenilatos encargados de la activación de una ARNasa latente (ARNasa L) que degrada el ARN, inhibiendo así la replicación viral. Por otra parte, el sistema OAS-ARNasa L puede conducir a la apoptosis de las células infectadas.

- La adenosindesaminasa específica de ARN (ADAR), cuyo gen codificante es inducido transcripcionalmente. Esta enzima modifica las secuencias del ARN celular y viral, incrementando el número de proteínas mutadas en las células infectadas.

- Las proteínas Mx (con actividad GTPasa, enzima fosforilasa que hidroliza GTP), que no están presentes constitutivamente en las células normales, son también inducidas por hIFN-( $\alpha/\beta$ ) y poseen actividad antiviral contra un amplio rango de virus con genoma ARN al interactuar con las nucleocápsides virales e inhibir su transporte o alterar sus propiedades [13].

Los hIFNs de tipo I también median una poderosa acción inmunomoduladora tendiente a promover una efectiva respuesta inmunitaria antiviral. Favorecen la activación de macrófagos y células NK, potenciando su actividad citotóxica; ayudan a promover el desarrollo de la respuesta adaptativa al incrementar la expresión de las moléculas de clase I y II del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), junto a otros componentes involucrados en la presentación antigénica a linfocitos T. En conjunto, esto mejora la eficiencia de muerte de las células infectadas mediada por los linfocitos T citotóxicos. Además, los hIFNs de tipo I favorecen el secuestro de linfocitos en los ganglios linfáticos, lo cual promueve su activación y actúan de manera directa sobre los linfocitos T y B, guiando la progresión de la respuesta antiviral [17].

Otra acción mediada por los hIFN de tipo I es la inhibición de la proliferación de muchos tipos celulares, por medio de la regulación de diferentes genes involucrados en el ciclo celular, como los oncogenes c-myc, los genes codificantes de la ciclina D3, la fosfatasa CDC25A[4] y la quinasa dependiente de ciclina CDK-2 [18], o a través de la activación de diversos genes y proteínas pro-apoptóticas [19].

### **3. IFN- $\alpha$ HUMANO (hIFN- $\alpha$ )**

La familia del hIFN- $\alpha$  comprende una serie de proteínas con señalización extracelular, capaces de estimular el desarrollo de la respuesta inmune innata de forma inmediata y efectiva y de direccionar los procesos de transición desde la respuesta innata inicial hacia la adaptativa, a través de una amplia variedad de vías de señalización y mecanismos moleculares.

Entre los 14 genes de hIFN- $\alpha$ , han sido descritas alrededor de 23 secuencias que dan lugar a 12 proteínas diferentes de hIFN- $\alpha$ . Los subtipos de hIFN- $\alpha$  se designan con números y letras que indican la secuencia de aminoácidos en las posiciones 23 y 34. Las mezclas de distintos subtipos se designan con un código alfanumérico, por ejemplo, hIFN- $\alpha$ nl [20]. Si bien



se han estudiado ampliamente sus propiedades, del total de isoformas del hIFN- $\alpha$  sólo el hIFN- $\alpha$ 2 se emplea con fines terapéuticos [21].

Todos los subtipos de hIFN- $\alpha$  son proteínas de secreción, por lo que son sintetizadas como precursores que poseen un péptido señal de 23 aminoácidos en su extremo N-terminal. Las proteínas maduras de hIFN- $\alpha$  humano consisten en 166 aminoácidos, con excepción del hIFN- $\alpha$ 2 que posee 165 aminoácidos debido a una eliminación en la posición 44 [22]. Gran parte de su secuencia aminoacídica se encuentran conservada entre los diferentes subtipos de hIFN- $\alpha$ ; entre estos, cuatro cisteínas involucradas en la formación de dos puentes disulfuro [23].

Los principales subtipos de hIFN- $\alpha$  son hIFN- $\alpha$ 1a e hIFN- $\alpha$ 2b, los cuales constituyen aproximadamente un 30% y un 20% de todas las proteínas de hIFN- $\alpha$ , respectivamente. El locus de hIFN- $\alpha$ 2 comprende tres variantes: hIFN- $\alpha$ 2a, hIFN- $\alpha$ 2b e hIFN- $\alpha$ 2c, siendo el hIFN- $\alpha$ 2b el detectado predominantemente en el ADN genómico humano. Asimismo, dentro de la familia de los hIFNs- $\alpha$ , el hIFN- $\alpha$ 2b es el que despliega mayor actividad biológica, mientras que el hIFN- $\alpha$ 1 es el que exhibe la actividad más débil de todos los subtipos correspondientes [10].

La masa molecular aparente promedio de los subtipos de hIFN- $\alpha$  producidos en forma recombinante en bacterias, calculada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con el agregado de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), es de aproximadamente 19 kDa. Sin embargo, la masa molecular del hIFN- $\alpha$  derivado de leucocitos humanos inducidos por el virus Sendai varía entre 17,5 y 23,3 kDa, demostrando la existencia de modificaciones post-traduccionales en por lo menos uno de los subtipos [24–26].

La mayoría de las especies de hIFN- $\alpha$  no posee sitios de reconocimiento para N-glicosilación (Asn-Xaa-Ser/Thr). El hIFN- $\alpha$ 2 es el único subtipo de hIFN- $\alpha$  que se encuentra O-glicosilado, debido a la presencia de un residuo de Thr en la posición 106. En las demás proteínas de esta familia, dicha posición aminoacídica está ocupada por los residuos Gly, Ile o Glu [27,28].

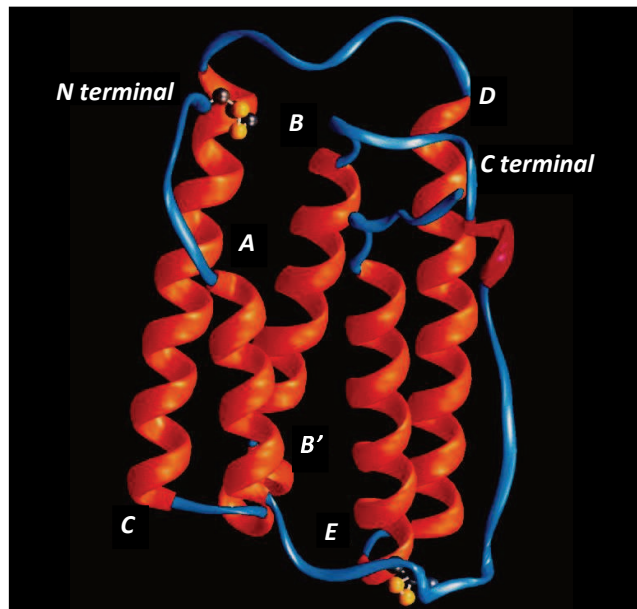
### **3.1. Estructura molecular del hIFN- $\alpha$ 2**

En 1996 se resolvió la estructura del hIFN- $\alpha$ 2 mediante cristalografía de rayos X.[29] Un año más tarde, fue posible generar una estructura de alta resolución en tres dimensiones, empleando espectroscopia heteronuclear multidimensional, NMR (Figura 3, [30]).

El hIFN- $\alpha$ 2 posee una estructura globular consistente en cinco hélices  $\alpha$  denominadas A (Ser11-Met21), B y B' (Thr52-Ser68, Lys70-Leu157), C (Glu78-Ile100), D (Leu110-Glu132) y E (Pro137-Leu157), conectadas mediante los lazos AB, BC, CD y DE. Existen dos puentes disulfuro

entre Cys1-Cys98 y Cys29-Cys138. Por medio del modelado tridimensional del hIFN- $\alpha$  se identificaron tres dominios dentro de la molécula que involucran los residuos aminoacídicos 29-35, 78-95 y 123-140. Los dominios 29-35 y 123-140 se encuentran muy próximos, lo cual posibilita la formación de un puente disulfuro entre Cys29-Cys138, y comprenden un sitio de reconocimiento del receptor. El tercer dominio (78-95) también juega un rol importante en la unión al receptor. La homología entre los diferentes subtipos de hIFN- $\alpha$  es mayor al 50%, con una conservación casi completa de los residuos involucrados en la unión al receptor [31].

Además, se ha demostrado que los residuos conservados de lisina cercanos a la región N terminal y los residuos de tirosina próximos al extremo C terminal de la proteína son críticos para el desarrollo de una actividad biológica óptima en los diferentes subtipos de hIFN- $\alpha$  [32].



**Figura 3.** Estructura del hIFN- $\alpha$ 2. Representación gráfica en forma de cintas de la estructura tridimensional del hIFN- $\alpha$ 2a. Las hélices  $\alpha$  (coloreadas en naranja) se designan con las letras A-E en la cercanía de su extremo N-terminal. Los extremos de la proteína se indican con las letras N y C. Los dos puentes disulfuro se muestran mediante una representación de esferas y bastones; los átomos de azufre se encuentran coloreados en amarillo y los átomos de carbono en gris. La figura fue preparada empleando el programa Ribbons 2.0. Figura modificada de Klaus y col., 1997 [30].

### 3.2. hIFN- $\alpha$ 2 como proteína terapéutica

Desde su descubrimiento en 1957 [33], los avances en biología molecular han posibilitado el reconocimiento de los mecanismos a partir de los cuales los IFNs interactúan con diferentes componentes celulares, así como muchas de sus funciones biológicas y

farmacológicas. Inicialmente, las preparaciones de hIFN- $\alpha$ 2 disponibles para uso clínico se obtenían a partir del cultivo de leucocitos estimulados con el virus Sendai, lo cual daba lugar un producto heterogéneo y de costos elevados. En 1980 comenzó a emplearse la tecnología del ADN recombinante con el objetivo de producir la citoquina en bacterias, permitiendo el cultivo y purificación masiva. Este avance dio lugar al interferón humano recombinante (rhIFN), el primer producto farmacéutico de la industria biotecnológica.

Actualmente, el rhIFN- $\alpha$  es usado en más de 40 países para el tratamiento de más de 14 tipos de cánceres. Las formas comerciales del rhIFN- $\alpha$ 2a (Roferon-A<sup>®</sup>, Hoffmann La Roche, Inc.) y del rhIFN- $\alpha$ 2b (Intron-A<sup>®</sup>, Schering Corporation), fueron las dos primeras moléculas de IFN licenciadas por la *Food and Drug Administration* (FDA, EE. UU.) en 1986, para el tratamiento de leucemia de células vellosas. Ambos IFNs derivan de bacterias *E. coli* modificadas genéticamente, tienen una actividad específica antiviral de aproximadamente  $2.10^8$  UI/mg y presentan un 95% de pureza determinada mediante SDS-PAGE, previo a la formulación [22]. Posteriormente, estos IFNs fueron aprovechados para usos clínicos en una variedad de patologías virales y tumorales, incluyendo el tratamiento para la hepatitis B y hepatitis C crónicas (con y sin el agente antiviral ribavirina) y para el Sarcoma de Kaposi, relacionado con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

El rhIFN- $\alpha$ 2b puede ser administrado en forma intramuscular, subcutánea o intravenosa. Si bien cada vía de administración resulta en un perfil farmacocinético diferente, todas producen una rápida inactivación y eliminación de la citoquina de los fluidos y tejidos biológicos (4-8 h en humanos). El catabolismo del rhIFN- $\alpha$ 2 es fundamentalmente renal, mediante filtración glomerular y reabsorción tubular, en la que se produce su degradación proteolítica.[20,34] Dada la corta vida media de la proteína, los tratamientos con rhIFN- $\alpha$ 2 requieren la aplicación de frecuentes y elevadas dosis de la citoquina para alcanzar la ventana terapéutica. Esto puede conducir a la aparición de efectos adversos al tratamiento y generalmente, cuanto mayor es la dosis de IFN administrado y más prolongado es el tratamiento, se observan efectos adversos más frecuentes y severos. Los más comunes son síntomas gripales como fiebre, fatiga, mialgia, escalofríos y dolor de cabeza, aunque también pueden tener lugar efectos secundarios sub-agudos y crónicos tales como mielosupresión, efectos neuropsiquiátricos y desarrollo de anticuerpos contra la proteína, entre otros [35].

### **3.2.1. Estrategias de mejoramiento del rhIFN- $\alpha$ 2b como agente terapéutico**

Debido a la rápida eliminación del rhIFN- $\alpha$ 2 de la circulación, diversas estrategias han sido propuestas con el fin de mejorar sus propiedades farmacocinéticas *in vivo* y, en consecuencia, su eficacia terapéutica, reduciendo la probabilidad de aparición de reacciones no deseadas. Una de estas estrategias es la pegilación, una forma de modificación química que puede ser utilizada para extender el tiempo de acción de una proteína, ya que modula tanto la eliminación renal como la mediada por receptor, minimizando a su vez la proteólisis. Esta técnica consiste en unir, covalente o reversiblemente, una molécula de polietilenglicol (PEG) a la proteína, a través de un grupo reactivo (amina, tiol o ácido carboxílico). El PEG es un polímero hidrosoluble no inmunogénico y no tóxico, con un tamaño que varía entre 3,5 a 40 kDa en su forma lineal o estructurada (ramificado/bifurcado). La amplitud de tamaño, la forma y la química permiten numerosas variaciones de la proteína generando un bioterapéutico de larga vida con tiempo de acción apropiado [36]. En los años 2001 y 2002 fue aprobada en EE.UU. la terapia con la variante pegilada de las dos formas comerciales del rhIFN- $\alpha$ 2: rhIFN- $\alpha$ 2a y rhIFN- $\alpha$ 2b, tanto solas como combinada con ribavirina, para el tratamiento de la hepatitis C crónica. El rhIFN- $\alpha$ 2b pegilado (PEG-INTRON<sup>®</sup>, Schering Corporation), conocido en la bibliografía como IFN- $\alpha$ 2b-PEG, es un conjugado covalente de rhIFN- $\alpha$ 2b con una única cadena de polietilenglicol. Su principal característica ventajosa radica en el hecho de que presenta una vida media más prolongada, permitiendo la reducción en el número de dosis necesarias para el tratamiento de la enfermedad. Con la incorporación de la forma pegilada del rhIFN- $\alpha$ 2 a la terapia combinatoria con ribavirina ha sido posible introducir notables mejoras, maximizando la respuesta antiviral del terapéutico [37]. Sin embargo, los efectos no deseados de este tipo de productos pueden ser similares a los generados por IFNs no pegilados, existiendo incluso casos de desarrollo de respuesta inmune contra la proteína, en pacientes con hepatitis C crónica tratados con IFN- $\alpha$ 2-PEG y ribavirina [38]. Además, estudios *ex vivo* de inmunogenicidad empleando células mononucleares de sangre periférica humana, revelaron la presencia de epitopes T potencialmente inmunogénicos en la citoquina pegilada [39].

Otra estrategia ampliamente utilizada para mejorar las propiedades farmacocinéticas de proteínas de uso terapéutico es la glicoingeniería. Esta metodología se basa en la modificación del contenido y/o la estructura de los glúcidos de proteínas y/o glicoproteínas. La glicosilación es un evento post/co-traducciona importante que realizan las células eucariotas y que influye en muchas propiedades de las glicoproteínas como la solubilidad, farmacocinética, bioactividad, secreción, velocidad de depuración y antigenicidad/inmunogenicidad [40,41]. Mediante el uso de esta tecnología, en nuestro laboratorio se ha desarrollado una variante hiperglicosilada del rhIFN- $\alpha$ 2b, conocida en la bibliografía como IFN-4N debido a que cuenta

con 4 sitios adicionales de N-glicosilación [42]. La nueva variante de rhIFN- $\alpha$ 2b presentó una vida media plasmática 25 veces superior con respecto a la citoquina *wild type* (IFN-WT, proteína que porta la O-glicosilación naturalmente presente en la citoquina secretada). Sin embargo, las modificaciones introducidas generaron una reducción de aproximadamente el 80% en la actividad biológica del terapéutico [39].

Alternativamente, la fusión de péptidos portadores de sitios potenciales de N- y O-glicosilación, es una estrategia que permite modificar las propiedades farmacocinéticas de las proteínas sin generar un impacto negativo en su estructura y/o función. A diferencia de las N-glicosilaciones, la predicción de sitios potenciales de O-glicosilación representa un desafío en la actualidad debido a que no se ha definido aún una secuencia consenso, aunque si existe evidencia de que ésta tiene lugar en regiones ricas en Ser, Thr y Pro [43,44]. En línea con esta noción, el trabajo realizado por Sales [45] propuso aumentar el grado de O-glicosilación del IFN-WT, a partir de su fusión a la etiqueta peptídica GMOP de 14 aminoácidos de longitud, derivada de la región N-terminal del GM-CSF humano, de la cual existe evidencia experimental que demuestra la presencia de 4 sitios potenciales de O-glicosilación. La proteína resultante, GMOP-IFN, ha mostrado características mejoradas con respecto a la citoquina original en cuanto al perfil farmacocinético y la actividad biológica, lo cual la sitúa como un candidato terapéutico muy promisorio en la industria farmacéutica. Sin embargo, ningún estudio se ha realizado a los efectos de analizar su inmunogenicidad.

#### **4. INMUNOGENICIDAD DEL rhIFN- $\alpha$**

El principio de tolerancia inmunitaria sugiere que las proteínas terapéuticas derivadas de proteínas autólogas humanas, como es el caso del rhIFN- $\alpha$ 2b, no deberían desencadenar una respuesta inmune contra la droga. Sin embargo, factores tales como la frecuencia y vía de administración, la dosis, las contaminaciones, como así también ciertos factores asociados con el paciente pueden generar la ruptura de dicha tolerancia. Esta respuesta inmune indeseada generalmente de tipo celular y humoral puede presentar variada complejidad y gravedad según las circunstancias. Por ejemplo, el desarrollo de anticuerpos específicos contra la proteína, o ADAs (del inglés *Anti Drug Antibodies*) desarrollados como consecuencia de la terapia con rhIFN- $\alpha$  puede impactar tanto en la eficacia del producto terapéutico, al neutralizar o disminuir su efecto, como en la seguridad del mismo. En ciertos contextos, estos eventos pueden exacerbar o inducir el desarrollo de enfermedades autoinmunes (EAs) tales como el lupus eritematoso, tanto sistémico como cutáneo, el síndrome de Sjogren, la

dermatomiositis y la polimiositis, la esclerosis sistémica y la artritis reumatoidea, entre otras [46].

La aparente inducción o exacerbación de una EA preexistente es un hecho relativamente frecuente en pacientes tratados con rhIFN- $\alpha$  [35,47–49]. Tanto el acervo genético del individuo como las características de la enfermedad para la que se ha indicado el tratamiento determinarán, principalmente, las manifestaciones de la EA desarrollada. En estudios de asociación del genoma completo se han identificado ciertos alelos vinculados con la susceptibilidad a un número de EA, algunos de los cuales codifican proteínas involucradas en las vías de señalización o inducción del IFN [35,50].

Los resultados de numerosos estudios han demostrado que el desarrollo de ADAs presenta una tasa de ocurrencia muy variable en pacientes con hepatitis C tratados con rhIFN- $\alpha$ , pudiendo tener una incidencia de hasta el 60% [46,51,52]. Estos anticuerpos podrían ser la causa del fracaso terapéutico de la citoquina durante tratamientos crónicos, ya que su unión a la molécula de IFN podría ocasionar una pérdida en su actividad o alteraciones en sus propiedades farmacocinéticas.

#### **4.1. Generación de ADAs**

La generación de ADAs se produce como consecuencia de múltiples factores, que actúan en forma individual o combinada [53]. Entre ellos, la dosis, la frecuencia y la ruta de administración, la duración del tratamiento, la presencia de agregados, glicosilaciones o contaminantes, la formulación y la inmunogenicidad intrínseca de la proteína, ocupan un lugar de preponderancia. Además, existe evidencia que muestra que la incidencia en la producción de anticuerpos varía de acuerdo a la enfermedad para la que se haya indicado el terapéutico y a factores relacionados con el paciente, tales como su estado inmunológico, características genéticas, edad, intensidad del tratamiento en la primera dosis, entre otros [54].

La mayoría de los efectos adversos resultantes del desencadenamiento de una respuesta inmune contra una proteína terapéutica están fundamentalmente mediados por mecanismos humorales, por lo que la presencia de anticuerpos circulantes contra la proteína terapéutica ha sido el criterio para definir la existencia de respuesta inmune hacia este tipo de productos. En este sentido, dado que la tolerancia es considerada como el estado normal de la respuesta inmune frente a proteínas autólogas, el desarrollo de ADAs hacia una proteína autóloga recombinante se puede considerar como un quiebre en la tolerancia inmunológica [55].

En general, las células T y B cuyos receptores reconocen antígenos propios, son eliminadas durante la maduración del sistema inmune en el timo (para las células T) y en la médula ósea (para células B). Sin embargo, existe evidencia de la presencia de células T auto-reactivas en circulación en sangre periférica que han escapado a los mecanismos de selección en el timo. De hecho, entre el 25 y el 40% de las células T auto-reactivas escapan hacia la periferia por poseer baja avidéz [56,57] o por ausencia de expresión o procesamiento de los epítopes T en el timo [58]. Teniendo en cuenta esto, no resulta sorprendente que en algunos pacientes tratados con IFN- $\alpha$  se produzca una respuesta inmune mediada por células T.

En el contexto de una respuesta mediada por células B, el desarrollo de anticuerpos puede ser independiente de linfocitos T (Ti) o dependiente de linfocitos T (Td). La activación de células B en una respuesta de tipo Ti tiene lugar cuando ciertos motivos estructurales de algunas moléculas, tales como repeticiones poliméricas, inducen la generación de las señales requeridas para estimular la activación de un grupo de células B. Este tipo de respuesta generalmente no conduce a la maduración de la afinidad de los anticuerpos producidos ni al desarrollo de células de memoria. Por el contrario, la activación Td de linfocitos B está relacionada fundamentalmente con la secuencia de la proteína y la respuesta humoral generada suele ser mucho más robusta, con maduración de la afinidad y cambio de isotipo de los anticuerpos producidos y desarrollo de células B de memoria [55].

En numerosos pacientes los ADAs desarrollados luego del tratamiento con rhIFN- $\alpha$  son fundamentalmente neutralizantes del tipo IgG [59], lo cual indica que la respuesta inmune generada por el terapéutico involucra la activación Td de linfocitos B, con cambio de isotipo y maduración de la afinidad de los anticuerpos producidos.

#### ***4.2. Células dendríticas, protagonistas esenciales en el desarrollo de la respuesta humoral***

La respuesta inmune desarrollada contra una proteína terapéutica con producción de ADAs comienza con el reconocimiento inmunológico de la molécula y su posterior internalización por parte de las células presentadoras de antígeno profesionales (CPAs). Estas CPAs son poblaciones celulares especializadas, principalmente células dendríticas, linfocitos B y macrófagos, que tienen la capacidad de capturar antígenos, procesarlos y presentarlos en su superficie a los linfocitos T y proveer señales que estimulen la proliferación y diferenciación de los mismos [60].

La CPA más efectiva es la célula dendrítica, dado que presenta la mayor capacidad de estimulación y activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes. Se estima que una célula dendrítica puede activar entre 100 y 3000 linfocitos T [61].

Las células dendríticas comprenden una población celular heterogénea derivada de diferentes linajes hematopoyéticos y se caracterizan por poseer patrones específicos de localización con funciones inmunológicas especializadas, tanto en el desarrollo de la respuesta inmune como así también en la inducción de tolerancia [62]. La abundancia de células dendríticas en circulación es relativamente baja, sin embargo se encuentran ubicuamente distribuidas en los diferentes tejidos del organismo, funcionando como sensores muy eficientes del material extraño y potencialmente peligroso [63].

De acuerdo a sus características fenotípicas y funcionales, las células dendríticas pueden dividirse en dos grandes grupos: convencionales (CDc) y plasmocitoides (CDp). Desde el punto de vista fenotípico, ambas poblaciones celulares difieren en sus marcadores de superficie: las CDc expresan CD11c pero no CD123 (CD11c<sup>+</sup> CD123<sup>-</sup>) y las CDp expresan CD123 pero no CD11c (CD11c<sup>-</sup> CD123<sup>+</sup>). Desde el punto de vista funcional también presentan notables diferencias: mientras que la función central de las CDp consiste en mediar una poderosa respuesta antiviral a través de la secreción de grandes cantidades de IFNs de tipo I en la fase aguda de la infección, las CDc tienen como función principal activar a los linfocitos T vírgenes y orientar el curso de la inmunidad adaptativa. Luego de su activación, producto del reconocimiento antigénico y complejas señales extracelulares, las CDc presentes en los diversos tejidos (piel, mucosas, parénquima de los órganos, etc) migran hacia los órganos linfáticos, sitio en el que llevarán a cabo la presentación del antígeno capturado a los linfocitos T vírgenes. Por lo tanto, estas células cumplen un rol fundamental tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa, siendo consideradas como un nexo entre ambos componentes del sistema inmune [60].

Cuando una proteína terapéutica ingresa al organismo, las CDc que residen en el tejido donde se deposita el producto, internalizan la proteína, la procesan y presentan los péptidos derivados a los linfocitos T-CD4<sup>+</sup>. Por este motivo, en el presente trabajo el término célula dendrítica se empleará exclusivamente para hacer referencia a la subpoblación de CDc. Una característica importante entre las propiedades funcionales de esta población es su maduración, un proceso de diferenciación a través del cual las células especializadas en la captura antígenos se transforman en células especializadas en la estimulación de linfocitos T [64].

Cuando son aún inmaduras, las células dendríticas se caracterizan por poseer gran capacidad endocítica y de procesamiento antigénico y bajo potencial de activación de



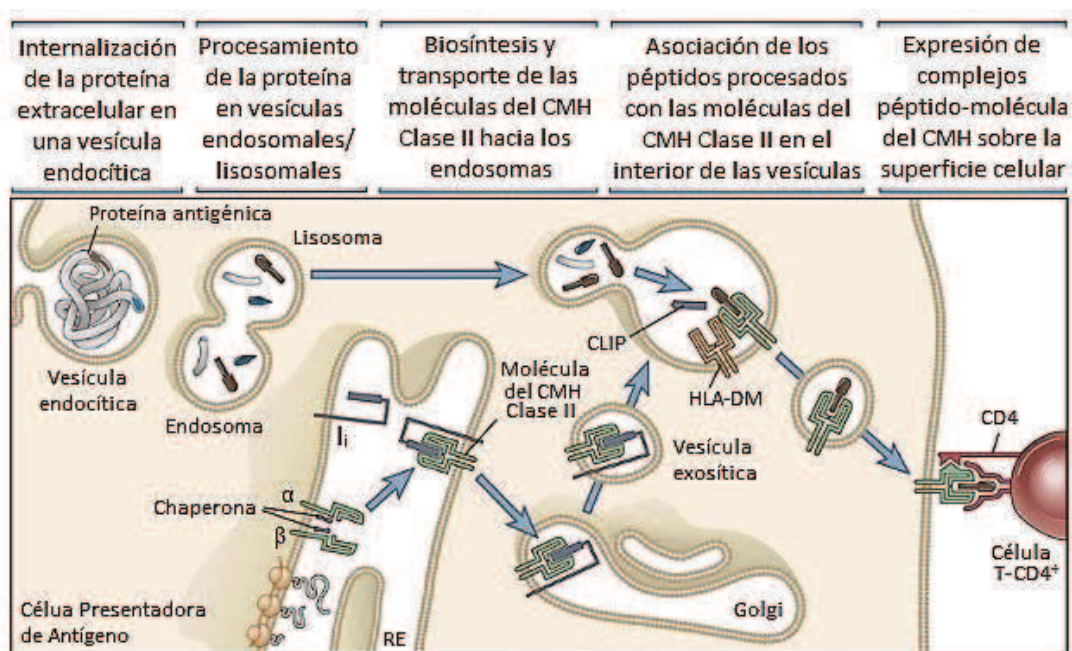
linfocitos T. En este estadio estas células no expresan cantidades significativas de moléculas coestimuladoras como CD80 (B7.1), CD86 (B7.2) y CD54 (ICAM-1), entre otras moléculas esenciales para la estimulación de células T [61]. La función principal de las células dendríticas inmaduras consiste en monitorear constantemente el medio que las rodea en busca de antígenos. Para alcanzar el estado de maduración es necesario que identifiquen una señal “no propia”, a través del reconocimiento de diferentes patrones moleculares por medio de diversos tipos de receptores. Estos receptores incluyen miembros de la familia de las lectinas de tipo C (DEC-205, DCIR, Dectin-2 y CLEC-1), miembros de la familia de las inmunoglobulinas (DORA e ILT3), receptores de proteínas de choque térmico, receptores de tipo toll (TLR) como TLR-3 y TLR-4 y receptores del fragmento constante (Fc) de las inmunoglobulinas como FcγR y FcεR, entre otros [65]. Al entrar en contacto con el antígeno, internalizarlo y procesarlo, la célula dendrítica comienza su proceso de maduración, guiado además por citoquinas del medio extracelular (como TNF-α o IFN-γ) y por interacciones establecidas con otras células del sistema inmune [14].

Durante su maduración, las células dendríticas experimentan un conjunto de cambios que les permitirán, en última instancia, activar a los linfocitos T vírgenes. Comienzan a disminuir notablemente su capacidad de endocitosis y procesamiento antigénico, lo que limita el repertorio de antígenos presentados por estas células a aquellos capturados en el foco infeccioso. Al mismo tiempo se incrementa la expresión de la molécula CCR7, receptor de las quimiocinas CCL19 y CCL21, las cuales son producidas constitutivamente en los ganglios linfáticos y que se encuentran también en los vasos linfáticos. De esta manera, la expresión de CCR7 permite la migración de las células dendríticas maduras, a través de los vasos linfáticos aferentes, hacia los órganos linfáticos drenantes del sitio de infección. La maduración de las células dendríticas se asocia también con una disminución de la expresión de moléculas tales como la E-cadherina (molécula encargada de establecer uniones entre las células dendríticas y las células epiteliales de los diferentes tejidos) favoreciendo la migración hacia los ganglios linfáticos. Además, se incrementa notablemente la expresión de las moléculas asociadas con el proceso de presentación antigénica: moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (CMH-I) y clase II (CMH-II) y moléculas coestimuladoras (CD80, CD86, CD54). Por último, durante el proceso de maduración se estimula también la producción de un conjunto de citoquinas, cuyo patrón particular dependerá del tipo de respuesta inmune que se esté desarrollando. En la Tabla 1 se resumen las principales características de las células dendríticas en sus dos estadios de maduración.

**Tabla 1.** Propiedades de las células dendríticas maduras e inmaduras [14,66].

Propiedad	Células dendríticas	
	INMADURAS	MADURAS
Ubicación	Tejidos periféricos	Órganos linfáticos secundarios
Expresión de receptores del fragmento Fc de Igs	Alta	Baja
Capacidad endocítica	Alta	Baja
Capacidad de procesamiento antigénico	Alta	Baja
Expresión de moléculas coestimuladoras (CD80/86, CD54)	Baja	Alta
Expresión del receptor de quimiocinas CCR7	Baja	Alta
Vida media de las moléculas del CMH-II	~10 h	>100 h
Número de moléculas del CMH-II en superficie	~1.10 <sup>6</sup>	~7.10 <sup>6</sup>

El proceso de presentación de antígenos extracelulares (esto incluye a las proteínas terapéuticas) a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes se inicia con la captura del antígeno por parte de las células dendríticas inmaduras. En la Figura 4 se muestra un esquema del mecanismo de presentación antigénica que se describe a continuación.



**Figura 4.** Presentación antigénica a través de las moléculas del CMH-II. Los pasos involucrados en el procesamiento de antígenos extracelulares se describen en el texto. CLIP: péptido de la cadena invariante asociada a moléculas del CMH-II; RE: retículo endoplasmático; Ii: cadena invariante. Figura modificada de Abbas y col., 2015 [60].

Inicialmente, la proteína es internalizada en vesículas endocíticas que se fusionan luego con los lisosomas, los cuales contienen proteasas capaces de degradar la molécula en

pequeños fragmentos peptídicos. Al mismo tiempo, las moléculas del CMH-II son sintetizadas en el retículo endoplasmático (RE) asociadas a una cadena, la cadena invariante ( $I_i$ ). Esta  $I_i$  ocupa una hendidura (también llamada “bolsillo”) en la molécula del CMH-II recientemente sintetizada, en la que se producirá luego la unión peptídica. Esta  $I_i$  promueve el plegado y ensamblado de las moléculas del CMH-II y direcciona el transporte de las mismas en vesículas exocíticas hacia los endosomas, que contienen los antígenos internalizados y procesados. Una vez que se encuentran en el interior de estas vesículas endosomales la  $I_i$  se disocia de la molécula del CMH-II, por medio de la acción de enzimas proteolíticas que dejan un péptido de 24 aminoácidos de longitud, llamado CLIP (del inglés *Class II-associated Invariant Chain Peptide*), ocupando el surco de unión al antígeno de las moléculas del CMH-II. Posteriormente, el péptido CLIP es removido por medio de la acción de una molécula llamada HLA-DM, la cual presenta una estructura similar a las moléculas del CMH-II y que co-localiza con éstas en el compartimiento endosómico. Esta molécula actúa como un intercambiador peptídico, facilitando la remoción del péptido CLIP de la hendidura de las CMH-II y la posterior unión de los péptidos antigénicos circundantes. De esta manera, se generan diversos complejos péptido-CMH-II, los cuales serán luego transportados a la superficie celular para ser presentados a las células T-CD4<sup>+</sup> [60].

#### **4.3. Activación de linfocitos T-CD4<sup>+</sup> vírgenes**

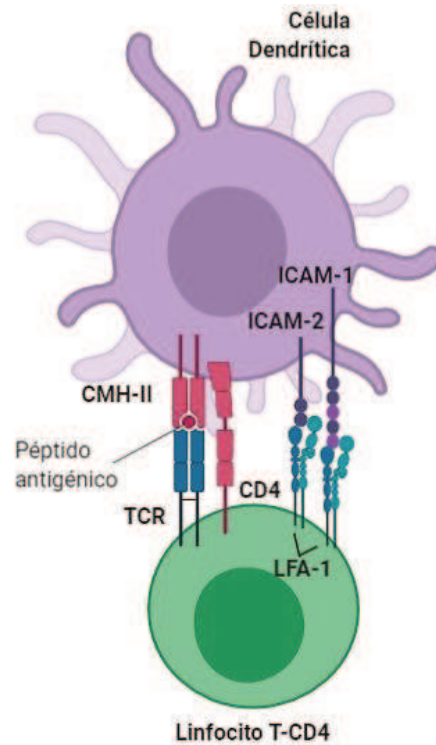
Los linfocitos T son células especializadas del sistema inmune capaces de mediar funciones tanto efectoras, destinadas fundamentalmente a remover infecciones, como supresoras, capaces de promover la tolerancia inmunológica. Los linfocitos T se originan en la médula ósea pero su maduración tiene lugar en el timo. Una vez que son exportados hacia la periferia constituyen una amplia diversidad de subpoblaciones de linfocitos T, que se pueden agrupar en cuatro grandes categorías según la función que desempeñan: citotóxicos (o linfocitos T-CD8<sup>+</sup>), colaboradores (o linfocitos T-CD4<sup>+</sup>), regulatorios y de memoria. En todos los casos, los linfocitos T reconocen los antígenos presentados en la superficie de otras células, utilizando un receptor específico denominado TCR (*T-cell receptor*) y ejercen su acción por medio de la liberación de diferentes conjuntos de citoquinas.

Los linfocitos T-CD4<sup>+</sup> intervienen en una variedad de eventos en el sistema inmune adaptativo tanto celular como humoral: colaboran en las respuestas de los linfocitos T-CD8<sup>+</sup> vírgenes (*naïve*) y de los linfocitos B, generan respuestas secundarias y contribuyen a la inducción y sostenibilidad de la memoria inmunitaria [67]. La señal inicial de activación de los linfocitos T-CD4<sup>+</sup> vírgenes está dada por la interacción con las CPAs, mediante la cual los

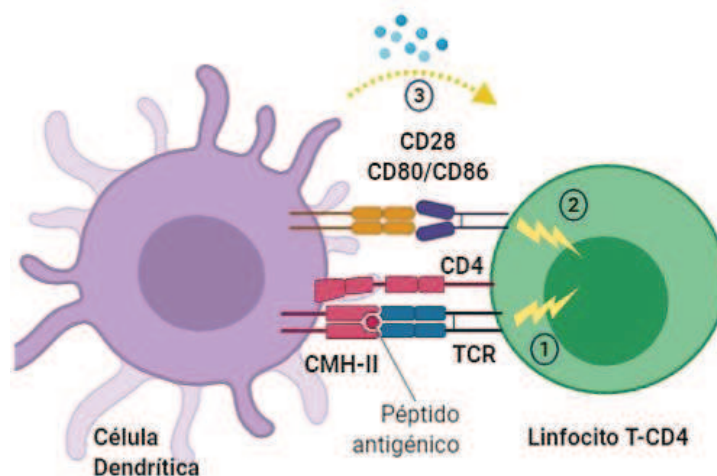
linfocitos T-CD4<sup>+</sup> son capaces de reconocer específicamente los péptidos derivados del procesamiento antigénico, expuestos en la superficie de las CPAs en el contexto de las moléculas del CMH-II, a través del TCR. El TCR está formado por dos cadenas distintas, que conforman un heterodímero anclado a la membrana celular. Por su estructura, estas cadenas pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, y al igual que éstas, presentan un dominio de elevada variabilidad en la zona aminoterminal y un dominio constante en la región carboxiterminal. Esta gran variabilidad del TCR, concentrada básicamente en la región que permite el reconocimiento antigénico, da lugar a la existencia de un amplio repertorio de receptores, integrado por millones de especificidades diferentes. Cada linfocito expresa un único tipo de TCR, con especificidad singular, constituyendo así una gran población celular compuesta por centenares de millones de clones diferentes [66].

El reconocimiento de un determinado complejo péptido-molécula del CMH-II por parte un linfocito T-CD4<sup>+</sup> virgen pone en marcha una serie de vías transduccionales que provocan un incremento en la afinidad de una integrina expresada en la superficie de la célula T, la molécula LFA-1 (*Lymphocyte Function-associated Antigen 1*), hacia las moléculas ICAM-1 e ICAM-2 (ICAM, *Intercellular Adhesion Molecule*), presentes en la superficie de la célula dendrítica madura. Esta interacción estabiliza la unión entre ambas células, a fin de que el linfocito T pueda reconocer adecuadamente el péptido antigénico presentado. Además, la molécula correceptora CD4, presente en la superficie de la célula T, facilita este reconocimiento al interactuar con ciertos residuos conservados de la molécula del CMH-II, lo que estabiliza la interacción del TCR con el péptido (Figura 5) [66].

La interacción del TCR del linfocito T-CD4<sup>+</sup> virgen con un epítipo antigénico constituye la primera señal necesaria para la activación del linfocito. Para completar dicho proceso es requerida una segunda señal, la cual es inducida por la interacción establecida entre las moléculas CD80 y CD86, expresadas por las células dendríticas maduras, y la molécula CD28, expresada en forma constitutiva por las células T vírgenes. El entrecruzamiento de CD28, inducido por la interacción con CD80 y CD86, provee la señal 2 de activación del linfocito T, permitiéndole expresar un receptor de IL-2 de alta afinidad y comenzar la producción de la propia IL-2, que actuará estimulando la expansión clonal T de manera autócrina y parácrina. Aquellos linfocitos T vírgenes que no perciban esta última señal sufrirán un proceso de anergia irreversible, que conducirá a su muerte. Es decir que solo si la célula dendrítica expresa suficiente cantidad de moléculas coestimuladoras, el reconocimiento antigénico se traducirá en activación y expansión clonal del linfocito T, capaz de interactuar con los linfocitos B y mediar su activación y consecuente producción de anticuerpos [67,68]. En la Figura 6 se ilustra la interacción entre una célula T-CD4<sup>+</sup> virgen y una célula dendrítica madura.



**Figura 5.** El reconocimiento antigénico estabiliza la unión entre la célula dendrítica y el linfocito T-CD4<sup>+</sup>. El reconocimiento del péptido antigénico, presentado por moléculas del CMH-II, a través del TCR induce un cambio conformacional en la integrina LFA-1 expresada en la célula T que produce un incremento en su afinidad por las moléculas ICAM-1 e ICAM-2 expresadas por la célula dendrítica, estabilizando la unión entre ambas células. La interacción de la molécula CD4 con la molécula del CMH-II facilita el reconocimiento antigénico al estabilizar la unión del TCR con el complejo péptido-molécula del CMH. Figura modificada de Fainboim y Geffner, 2011 [66].



**Figura 6.** La activación del linfocito T requiere de tres señales. La primera señal es inducida por el reconocimiento del péptido antigénico por parte del TCR. La segunda señal (coestimulación) es inducida por la interacción entre CD80/CD86, expresadas en la CPA y CD28, en la superficie de la célula T. La tercera y última señal requerida para completar la activación del linfocito T la constituye el conjunto de citoquinas liberadas por la célula dendrítica activada, las cuales guiarán además la progresión de la respuesta inmune hacia el perfil de respuesta T requerido. Figura modificada de Fainboim y Geffner, 2011 [66].

Los linfocitos T-CD4<sup>+</sup> activados pueden diferenciarse en muy diversos perfiles de respuesta, especializándose en la producción de un conjunto de citoquinas particulares según el perfil que hayan adoptado. Estas citoquinas guiarán la progresión de la respuesta inmune en diferentes sentidos, según el tipo de respuesta que se esté desarrollando.

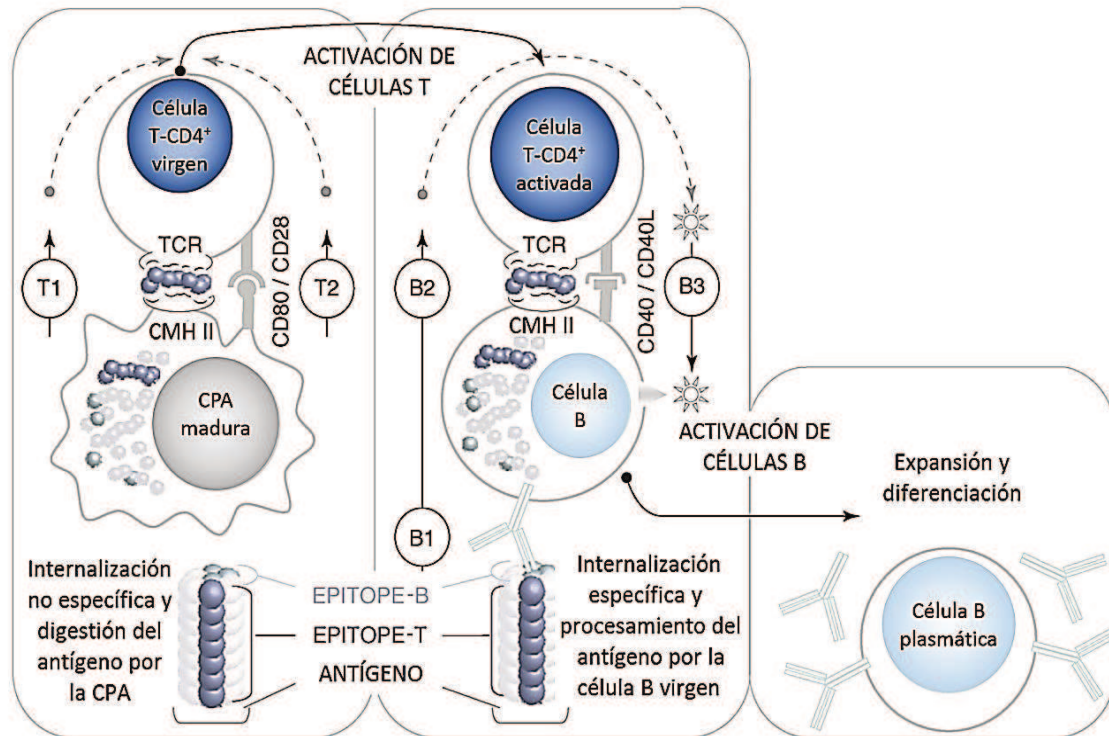
#### **4.4. Activación Td de linfocitos B y producción de ADAs**

Durante su desarrollo en la médula ósea, los linfocitos B adquieren el receptor antigénico denominado BCR (*B-cell receptor*), el cual está constituido por una inmunoglobulina (Ig) de superficie (IgM/IgD) asociada con un heterodímero (Ig $\alpha$ -Ig $\beta$ ). Cuando la inmunoglobulina de superficie reconoce específicamente los epitopes antigénicos de la proteína en su conformación nativa, se induce el entrecruzamiento del receptor. La agregación del BCR en la superficie del linfocito B constituye la primera señal necesaria para su activación y promueve la internalización de la proteína completa, que será luego procesada en pequeños péptidos antigénicos. Posteriormente, los epitopes peptídicos resultantes del procesamiento de la proteína se asocian con las moléculas del CMH-II, tal como sucede en la presentación antigénica mediada por células dendríticas, y se trasladan a la membrana celular [55].

Para que se complete la activación de los linfocitos B (además del reconocimiento específico del antígeno, su procesamiento y presentación en la superficie) es necesaria una segunda señal, la cual está dada, en primer lugar, por la interacción del TCR de la célula T-CD4<sup>+</sup> activada, con los complejos péptido-molécula del CMH-II presentes en la superficie del linfocito B. Esta unión estimula la expresión de la molécula CD40 en la superficie de la célula B y la secreción de diversas citoquinas por parte de la célula T. Adicionalmente, se requiere un segundo punto de contacto entre los linfocitos B y los linfocitos T, que ocurre a través de la molécula CD40 y su ligando, CD154 (CD40L), presente en la superficie de los linfocitos T.

De esta manera, cuando ambas interacciones han tenido lugar, se completa la segunda señal de activación de las células B, que dará lugar a la producción de anticuerpos. Sin la participación de los linfocitos T, que proveen la segunda señal, los linfocitos B sufren una muerte celular programada o apoptosis.

En la Figura 7 se muestra un resumen del proceso de activación de linfocitos B dependiente de linfocitos T.



**Figura 7.** Esquema de la activación de linfocitos B dependiente de linfocitos T. El primer paso en una respuesta inmune de tipo Td es la internalización no-específica del antígeno proteico mediada por las CPAs profesionales (células dendríticas). Estas células procesan el antígeno, degradándolo en pequeños péptidos que son luego presentados a las células T vírgenes en el contexto de las moléculas del CMH-II. La interacción entre el complejo péptido-molécula del CMH-II y el TCR del linfocito T está indicada como la señal 1 de activación de las células T (T1). Las señales provenientes de las moléculas coestimuladoras están representadas como la señal T2. Para iniciar la activación de la célula B se requiere el reconocimiento del antígeno en su conformación nativa, a través de sus receptores IgM/IgD de superficie (señal B1). Este linfocito B internaliza el antígeno y presenta luego los epitopes T en el contexto de las moléculas del CMH-II. La célula T previamente activada es capaz de reconocer, a través de su TCR, el antígeno presentado en la superficie de la célula B, secretando citoquinas que favorecerán la activación de los linfocitos B (señal B2). Esto produce un aumento en la expresión de CD40 en la superficie de la célula B, dando lugar a la interacción entre CD40 y CD40L, presente en el linfocito T (señal indicada como B3). Este conjunto de eventos conduce a la activación, proliferación y diferenciación de las células B secretoras de anticuerpos, conocidas como células B plasmáticas. Figura modificada de De Groot y Scott, 2007 [55].

## 5. ESTRATEGIAS DE ANÁLISIS DE LA INMUNOGENICIDAD POTENCIAL DE LAS PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS

Debido al impacto de la inmunogenicidad de las proteínas terapéuticas sobre la seguridad y eficacia del tratamiento, las agencias regulatorias de los EE. UU. (FDA, *Food and Drug Administration*) y Europa (EMA, *European Medicines Agency*), han desarrollado minuciosas guías en las que se describen los principales aspectos a tener en cuenta al momento de informar la inmunogenicidad potencial del producto. En efecto, actualmente estos ensayos constituyen uno de los requisitos necesarios para realizar el registro inicial de nuevos candidatos terapéuticos [69].

Las células T-CD4<sup>+</sup> cumplen un rol central en la activación de los linfocitos B y en el proceso de maduración de la afinidad y cambio de isotipo de los anticuerpos que éstos producen. El paso crítico en la activación de linfocitos T-CD4<sup>+</sup> es el reconocimiento, por medio de su TCR, de los péptidos lineales expuestos en la superficie de las CPAs en el contexto de las moléculas del CMH-II, conocidas en humanos como HLA (del inglés *Human Leukocyte Antigen*). Es así que los ensayos de análisis de riesgo de inmunogenicidad apuntan a evaluar uno o más aspectos que, eventualmente, podrían dar lugar a la activación y proliferación de dichas células T antígeno-específicas [54].

Tales estrategias presentan ciertas limitaciones debido a la enorme dificultad que implica imitar el escenario que tiene lugar en una respuesta *in vivo*, en cual no sólo se encuentran presentes todos los componentes fundamentales del sistema inmune, sino que además esto ocurre en un entorno tisular con una arquitectura específica que difícilmente puede ser reproducida. Por este motivo, una variedad de metodologías *in silico*, *in vitro* e *in vivo* han sido desarrolladas, cuya aplicación conjunta ha demostrado ser de gran utilidad en numerosas circunstancias [70–77].

### **5.1. Métodos de predicción de la inmunogenicidad *in silico* mediante algoritmos computacionales**

La afinidad de unión de los péptidos derivados de las proteínas terapéuticas a las diferentes moléculas HLA es una característica particularmente importante en el contexto de la respuesta inmune frente a estos productos. Por este motivo, numerosos algoritmos han sido desarrollados en base a la identificación de aquellos péptidos con elevada probabilidad de unión a las moléculas HLA más predominantes en la población mundial [78,79]. La longitud de tales motivos de unión puede variar entre nueve y treinta aminoácidos, y propiedades como el tamaño, la carga y la polaridad de cada aminoácido en cada posición, determinarán la probabilidad de unión del péptido a una molécula HLA específica. Asimismo, las propiedades de las cadenas laterales de ciertos aminoácidos, ubicados en determinadas posiciones del “surco” o “bolsillo” de unión de las moléculas del CMH-II, ejercen un rol en la precisión de la predicción [80]. Sin embargo, debido a la forma relativamente abierta que presenta dicho bolsillo de unión, que permite que se acomoden péptidos de diversos tamaños, el estudio de esta interacción incluirá a aquellos aminoácidos que componen el núcleo o “core” central, así como a los residuos que flanquean el sitio de unión, posicionados por fuera del mismo [81,82].



De esta manera se asigna un valor o *score* de inmunogenicidad a cada péptido evaluado, que estará asociado a la probabilidad de dicha secuencia peptídica de interactuar con una molécula HLA específica (antigenicidad).

Numerosos algoritmos permiten predecir la antigenicidad/inmunogenicidad global de una proteína a partir del contenido de epitopes potencialmente antigénicos. Esto no sólo permite tener una noción del potencial inmunogénico sino además comparar la posible inmunogenicidad de distintas proteínas.

Las herramientas de predicción *in silico* actualmente disponibles constituyen métodos relativamente directos y accesibles para modelar las interacciones que ocurren entre los péptidos y las moléculas del CMH-II. La diferencia principal entre los algoritmos radica en su capacidad para predecir la inmunogenicidad global y los epitopes dentro de la proteína. En este sentido, si bien la información disponible en las bases de datos de epitopes juega un papel crítico en la asertividad de un determinado método de predicción, también es necesaria la validación experimental que respalde los resultados obtenidos a partir de estos algoritmos [83].

Entre la gran diversidad de algoritmos de mapeo de epitopes peptídicos disponibles se destacan: IEDB-MHCII, MHC2PRED, EpiTOP, MHCpred, SYFPEITHI, TEPITOPE, ProPred, Rankpep, NetMHCII, NetMHCIIpan y KernelRLSPan, entre otras.

Existen además una serie de algoritmos de predicción de epitopes desarrollados por compañías privadas, especialmente dedicadas al diseño e implementación de herramientas inmunoinformáticas para el mejoramiento de los productos ofrecidos por la industria biotecnológica. Tal es el caso del conjunto de herramientas ISPRI (del inglés *Interactive Screening and Protein Reengineering Interface*) provisto por la empresa *EpiVax Inc.*, que permite establecer predicciones de epitopes T para moléculas del CMH-II con elevado grado de precisión [78] y es el que se ha empleado en el presente estudio.

## **5.2. Validación experimental: ensayos *in vitro* y *ex vivo***

Las herramientas de predicción *in silico* de la inmunogenicidad de las proteínas terapéuticas son empleadas frecuentemente como una primera instancia del análisis, debido a su rápida y simple ejecución. Sin embargo, la mayoría de estas plataformas no contemplan factores clave como la estabilidad del complejo péptido-CMH-II o la influencia crítica que ejercen el procesamiento antigénico y el reconocimiento de los complejos péptido-molécula del CMH-II por el TCR en el desarrollo de una respuesta inmune. En consecuencia, este tipo de estudios puede sobreestimar la probabilidad de que un dado péptido forme parte del

peptidoma expuesto en la superficie de las CPA [84–86]. Por ello, la utilidad de los algoritmos inmunoinformáticos se limita a la de proveer una asistencia inicial en la identificación de aquellas secuencias peptídicas que tengan una capacidad potencial de unión a las moléculas del CMH-II. Luego de esto, se requerirán un conjunto de ensayos experimentales que permitan la confirmación de tales predicciones, para poder establecer un ordenamiento de los péptidos inmunogénicos de acuerdo a su capacidad de inducción de una respuesta inmune mediada por células T.

Con este propósito, se han desarrollado una amplia variedad de estrategias de validación experimental. Entre ellas se destacan los ensayos que evalúan la interacción de los péptidos sintéticos, que conforman la secuencia primaria de la proteína terapéutica, con los distintos alelos de las moléculas del HLA de clase II. Un set de alelos del HLA frecuentemente analizados son los alelos prototípicos DRB1\*0101, DRB1\*0301, DRB1\*0401, DRB1\*0701, DRB1\*0801, DRB1\*1101, DRB1\*1301 y DRB1\*1501, que representan más del 90% de la diversidad alélica de la población mundial.

Además, avances significativos en la tecnología de espectrometría de masas han permitido identificar los péptidos efectivamente procesados y presentados en la superficie de las CPAs por medio de la aplicación de la tecnología MAPPs (del inglés, *MHC-associated peptide proteomics*) [87]. Los resultados de estos ensayos confirman el rol fundamental del procesamiento natural de los antígenos en la identificación de potenciales epitopes para células T, evidenciado por el menor número de péptidos eluidos de los bolsillos de unión de las moléculas del HLA que los predichos por los análisis *in silico* e incluso por los ensayos de unión.

Una fuente adicional de información puede obtenerse a partir de la realización de ensayos *ex vivo*, es decir, empleando células provenientes de sangre periférica humana. Estos estudios permiten evaluar la internalización de la proteína terapéutica, su procesamiento y presentación de los epitopes peptídicos capaces de inducir proliferación celular, cambios fenotípicos y liberación de citoquinas por parte de las células T.

A partir de la asociación directa que existe entre la presencia de epitopes peptídicos reconocidos por las células T en una proteína terapéutica y el título y longevidad de ADAs desarrollados en pacientes [67], diversos métodos *ex vivo* han sido descriptos.

Entre ellos, se encuentra una estrategia descrita por Wullner y col.[88] que consiste en el tratamiento directo de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humana con la proteína de interés o con una mezcla de péptidos derivados de la misma. De esta manera, las CPAs presentes en la muestra endocitan, procesan y presentan los antígenos proteicos. Luego, los complejos péptido-molécula del CMH-II pueden ser reconocidos por las células T presentes entre las CMSP, dando lugar a su activación y proliferación. Finalmente, se

determina la respuesta inducida por la proteína terapéutica a través de la cuantificación de citoquinas características de los perfiles T efectores tales como IFN- $\gamma$  e IL-4, que caracterizan los perfiles Th1 y Th2, respectivamente.

Una metodología alternativa que permite analizar la respuesta inmune frente a proteínas terapéuticas fue descrita por Jaber y Baker [71], en la cual también se emplean CMSP humana pero realizando una etapa previa de separación de los monocitos y de las células T presentes en la muestra. Brevemente, el método consiste en aislar los monocitos presentes en la muestra de CMSP de cada donante, diferenciarlos a células dendríticas [89] e incubarlas luego con la proteína a evaluar. De esta manera, si en la muestra existen células T capaces de reconocer específicamente los complejos péptido-molécula del CMH-II presentados por las células dendríticas, tendrá lugar una proliferación linfocitaria y su posterior diferenciación en un perfil efector determinado.

El estudio final de la respuesta producida por las células T cultivadas *ex vivo* puede hacerse a través de diferentes ensayos. Los más sencillos consisten en la determinación de la proliferación celular, midiendo la incorporación de timidina marcada, o en la cuantificación de las citoquinas secretadas por parte de las células T antígeno-específicas por medio de técnicas de ELISA o del número de células T activadas, por medio de ensayos de ELISpot.

En conjunto, estas metodologías brindan información de la inmunogenicidad potencial de una proteína terapéutica. Sin embargo, presentan ciertas limitaciones, propias de las plataformas *in vitro*. Por este motivo, numerosos estudios *in vivo* han sido desarrollados en modelos animales, algunos de los cuales se describen a continuación.

### **5.3. Ensayos *in vivo***

Inicialmente, los ensayos *in vivo* se realizaban en modelos animales tradicionales, tales como ratas, ratones o primates no humanos, comúnmente utilizados para evaluar la seguridad y toxicidad de distintos tipos de fármacos. Sin embargo, estos modelos presentan una correlación limitada al momento de determinar el potencial inmunogénico de las proteínas terapéuticas en humanos, debido a que la mayoría de estas proteínas son percibidas como agentes extraños cuando son administradas a otras especies de mamíferos. En estos animales, el mecanismo inmunológico que se desencadena al administrar el terapéutico corresponde a la clásica respuesta hacia un antígeno extraño, y no al de ruptura de tolerancia. De hecho, existen evidencias de sobreestimaciones de la inmunogenicidad de ciertas proteínas terapéuticas, al comparar los resultados obtenidos a partir de modelos animales convencionales y los observados en pacientes [90].

Como consecuencia de ello, resulta difícil establecer un modelo animal que imite en forma precisa el escenario inmunológico que se establecerá cuando el terapéutico sea administrado en humanos.

Con el objetivo de superar estas limitaciones, distintos grupos de investigación han desarrollado modelos de ratones transgénicos que expresan la proteína humana de interés, y que son, por lo tanto, tolerantes a la misma [91–95]. Esto permite que los mecanismos que culminan con la formación de ADAs en animales tolerantes sean similares a los que ocurren en humanos, proporcionando un modelo de gran utilidad para realizar predicciones de nuevos epítopes en proteínas modificadas o llevar a cabo estudios de inmunogenicidad comparativa entre diferentes productos o de ruptura de la tolerancia [96]. Sin embargo, a pesar de que estos animales transgénicos constituyen una mayor aproximación *in vivo* que los ratones salvajes o *wild type*, presentan una limitación en cuanto a su capacidad de imitar la presentación antigénica humana, debido a la falta de homología entre las moléculas del CMH-II de ambas especies.

Para resolver este inconveniente, se han desarrollado ratones transgénicos a los que se les ha eliminado el sistema de presentación antigénica murino y en su lugar expresan diversos alelos del HLA. En efecto, se ha demostrado que los péptidos presentados por las moléculas del HLA de clase II en estos ratones son similares a aquellos identificados en pacientes que expresan dichos alelos [97].

Las moléculas del HLA de clase II están codificadas por genes localizados en el brazo corto del cromosoma 6 y se manifiestan como heterodímeros en la superficie celular, conformadas por una cadena  $\alpha$  y otra cadena  $\beta$ , cada una con dos dominios globulares extracelulares ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ). En el ser humano, existen tres grupos de genes altamente polimórficos que codifican las moléculas del CMH-II. Estos son HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR, y su expresión ocurre de manera codominante en la superficie celular. La susceptibilidad hacia numerosas enfermedades de etiología autoinmune está asociada con los alelos HLA-DQ y HLA-DR. Por ejemplo, se ha visto que la artritis reumatoidea se encuentra fuertemente asociada con los alelos del locus DRB1, mientras que la diabetes muestra una asociación mayor con los alelos DQB1. Este hecho no resulta sorprendente teniendo en cuenta el elevado grado de polimorfismo genético de las moléculas del HLA, las cuales cumplen un rol esencial en la selección del repertorio de células T en el timo y en la presentación antigénica en la periferia [98].

Se ha demostrado que las moléculas del HLA-DR tienen una mayor participación en la presentación antigénica a células T [99]. Por este motivo, para el estudio de la inmunogenicidad de las proteínas terapéuticas, se han desarrollado diferentes cepas de

ratones transgénicos que expresan algunos de los alelos más frecuentes del HLA-DR: HLA-DR1 (DRB1\*0101), HLA-DR3 (DRB1\*0301) y HLA-DR4 (DRB1\*0401), entre otras.

## **6. ¿PORQUÉ *rhIFN-α2* COMO TERAPIA ANTIVIRAL? ENFERMEDADES VIRALES EMERGENTES: ARBOVIRUS**

La elevada velocidad de expansión de las enfermedades generadas por los virus de origen zoonótico hacia nuevas regiones y la falta de drogas terapéuticas o profilácticas efectivas para la mayoría de éstas, constituyen una creciente amenaza a la salud pública. Esto pone de manifiesto la necesidad de identificar nuevos candidatos terapéuticos o incluso evaluar agentes antivirales pre-existentes efectivos. Un ejemplo de ello lo constituye el empleo de las formas pegiladas del *rhIFN-α2a* y *rhIFN-α2b* en combinación con distintos agentes antivirales, en el contexto de la pandemia de la enfermedad COVID-19 causada el virus SARS-CoV-2 (del inglés, *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*). Ambos terapéuticos fueron efectivos para el tratamiento de grupos relativamente pequeños de pacientes COVID-19 positivos [100,101]. Posteriormente, en un estudio que involucró 2165 pacientes positivos para COVID-19 tratados con *rhIFN-α* se observó una reducción significativa en la probabilidad de ingreso a cuidados intensivos, así como una mejora sustancial en la tasa de supervivencia para pacientes que sufrieron la enfermedad aguda [102].

La preocupación en torno a las enfermedades causadas por virus de origen zoonótico es creciente, dado que éstas constituyen la gran mayoría de las enfermedades infecciosas que afectan a los seres humanos, dando lugar a millones de muertes anualmente y enormes daños económicos a nivel mundial [103]. Los vectores más ampliamente diseminados de este tipo de virus son los artrópodos, particularmente insectos hematófagos (como mosquitos, moscas, garrapatas y otros), motivo por el cual se los denomina arbovirus (del inglés *arthropod-borne viruses*). Sin embargo, pese a su origen zoonótico, los seres humanos se han transformado en los huéspedes amplificadores primarios de estos virus, particularmente en las zonas urbanas [104].

Los principales vectores responsables de la transmisión de numerosos arbovirus son mosquitos del género *Aedes*, específicamente *A. aegypti* y *A. albopictus*. Tal es el caso de los virus de Zika (ZIKV, del inglés *zika virus*), chikungunya (CHIKV, del inglés *chikungunya virus*) y dengue (DENV, del inglés *dengue virus*). Estos agentes han experimentado una rápida expansión alrededor del mundo en las últimas décadas, dando lugar a brotes de gran escala en territorios del hemisferio occidental, en los que no se habían detectado previamente. Las infecciones producidas por ZIKV y CHIKV son enfermedades emergentes en América, mientras

que DENV continúa siendo el arbovirus con mayor prevalencia alrededor del mundo [105]. La epidemiología, los ciclos de transmisión en zonas urbanas y los síntomas clínicos al comienzo de las infecciones por ZIKV, CHIKV y DENV son muy similares, pese a que las complicaciones asociadas a cada enfermedad son marcadamente disímiles. Debido a su creciente incidencia, la acelerada expansión del rango geográfico, los posibles efectos asociados a la cocirculación de estos virus y a las impredecibles amenazas que representan para la salud mundial, estos virus han sido foco de gran interés en los últimos años. Así lo indicó la OMS al declarar como Emergencia de Salud Pública de Interés Internacional el incremento en los casos de microcefalia y síndrome Guillain-Barré (GBS), ambos causados por infección por ZIKV.

Dentro de los arbovirus emergentes, el DENV es aquel que presenta la mayor prevalencia y peligrosidad, pudiendo dar lugar a un amplio espectro de manifestaciones clínicas, desde síntomas gripales no específicos hasta un cuadro potencialmente mortal, llamado dengue grave o hemorrágico [106]. De acuerdo con la OMS, el DENV es el arbovirus más rápidamente diseminado a nivel mundial, siendo endémico en todas las regiones pobladas del mundo, a excepción de Europa continental [107]. En un estudio realizado en el año 2013 se reportó un drástico incremento en el número anual de casos con manifestaciones clínicamente significativas, pasando de 50 millones diagnosticados en 2009 a 96 millones de casos anuales en 2013 [108].

El ZIKV es un virus muy estrechamente relacionado al DENV, ambos miembros de la familia *Flaviviridae*, en el que también se incluyen el virus de la fiebre amarilla y el virus de West Nile, entre otros. La principal sintomatología incluye erupciones cutáneas, conjuntivitis y artralgias. Si bien el principal mecanismo de transmisión del ZIKV es por medio de la picadura de un mosquito infectado, diversos casos de contagio vía transmisión sexual, secreciones (saliva, orina) y transmisión perinatal han sido registrados [109,110]. Hasta el año 2007, en el que una gran epidemia de ZIKV en la Polinesia Francesa afectó al 73% de la población de la isla [111], este virus era relativamente desconocido, a excepción de pequeños brotes ocurridos en África y el Sudeste Asiático. En marzo de 2015 fue reportado el primer caso de infección por ZIKV en Brasil, llegando a 1,3 millones de casos para diciembre del mismo año. En abril del año siguiente, ZIKV se habría diseminado en 33 países [112].

El agente causal de la fiebre Chikungunya es otro arbovirus que ha expandido significativamente su rango geográfico durante el transcurso de los últimos años. Dicha expansión se produjo, presumiblemente, debido a la transmisión a través de viajeros que retornaban a sus ciudades de origen luego de haber contraído la infección en regiones endémicas o epidémicas. Esto contribuyó al establecimiento de focos autóctonos de transmisión del virus. CHIKV es un virus perteneciente a la familia *Togaviridae* que causa una

enfermedad gripal caracterizada por fiebres elevadas, artralgias severas, erupciones maculopapulares, dolor de cabeza, mialgias, poliartritis, entre otros síntomas. Si bien la fase aguda de la enfermedad dura tan solo una semana, los síntomas reumáticos pueden permanecer por muchos meses o incluso años. En consecuencia, se produce un deterioro significativo en la calidad de vida de los pacientes y en su capacidad para continuar con las actividades cotidianas, afectando asimismo la economía de las áreas endémicas [113].

En la actualidad no existen drogas terapéuticas ni profilácticas efectivas para las enfermedades causadas por ZIKV, CHIKV o DENGV, por lo cual los tratamientos se limitan a terapias paliativas como corticosteroides, antipiréticos o drogas anti-inflamatorias libres de esteroides, dando lugar a numerosos efectos adversos asociados a la auto-medicación [114,115]. Teniendo en cuenta la velocidad de expansión de estos virus hacia nuevas regiones y por consiguiente el creciente número de infecciones en humanos, la identificación de nuevos candidatos terapéuticos o de agentes antivirales pre-existentes efectivos para el tratamiento de estas enfermedades infecciosas, se torna un asunto de suma prioridad para la salud pública mundial.

En el contexto de las terapias antivirales actuales, el uso de hIFN $\alpha$  recombinante (rhIFN $\alpha$ ) en combinación con concentraciones clínicamente relevantes de favipiravir (agente antiviral empleado para el tratamiento de diversos virus de ARN) [116], ha demostrado producir una marcada inhibición del ZIKV *in vitro*. Dicha terapia permitió suprimir totalmente los efectos del virus sin exhibir citotoxicidad en las células no infectadas, incluso al utilizar dosis elevadas [117]. Un efecto sinérgico similar fue observado al evaluar una estrategia terapéutica que combina el uso de agentes antivirales dirigidos a las células huésped (rhIFN- $\alpha$  y rhIFN- $\beta$ ) y de acción directa (sofosbuvir) sobre la línea celular hepática Huh7, por medio de un ensayo de citoprotección. Los resultados revelaron un marcado descenso en el número de células infectadas por distintas cepas de ZIKV luego del tratamiento con sofosbuvir-rhIFN $\alpha$  (4,3-7,3% células infectadas), en comparación con los resultados obtenidos empleando sólo sofosbuvir o rhIFN $\alpha$  (30-46% y 8,2-17,2% células infectadas, respectivamente) [114].

Adicionalmente, la combinación de rhIFN- $\alpha$  con ribavirina ha evidenciado selectividad y eficacia contra la replicación del CHIKV *in vitro*, mostrando la mayor potencia entre un panel de diferentes compuestos antivirales [118]. Más recientemente otro grupo de trabajo ha demostrado la actividad sinérgica de la terapia combinada ribavirina-rhIFN $\alpha$ , cuya aplicación es capaz de reducir casi la totalidad de la carga viral de CHIKV durante las primeras 24h de tratamiento [119]. Asimismo, la terapia combinatoria ribavirina-rhIFN $\alpha$  en concentraciones clínicamente relevantes ha demostrado efectividad para la supresión del DENGV en la línea celular Huh7, acción mayormente atribuida a la actividad asociada al rhIFN $\alpha$  [120].

En conjunto, estos descubrimientos posicionan al rhIFN- $\alpha$  como un candidato terapéutico promisorio, en combinación con otros agentes antivirales, para las patologías emergentes causadas por diversas infecciones virales, tales como SARS-CoV-2, ZIKV, CHIKV y DENGV.



## »» OBJETIVOS

## **1. HIPÓTESIS DE TRABAJO**

Teniendo en cuenta que la activación inicial del sistema inmune adaptativo está mediada por la presentación de los complejos péptido antigénico-molécula del CMH II por las células dendríticas a los linfocitos T, se propuso la siguiente hipótesis de trabajo: el análisis *in silico* de la inmunogenicidad de la proteína de fusión GMOP-IFN permitirá identificar aquellos aminoácidos preponderantes en los epitopes T de la proteína. La mutación de los mismos permitirá disminuir el contenido de epitopes T de la citoquina, evitando la generación de disrupciones en la estructura, estabilidad y función biológica de la misma. De este modo, se postula que las muteínas desarrolladas presentarán una reducción en su potencial inmunogénico, conservando además la actividad antiviral *in vitro* y las propiedades farmacocinéticas favorables reportadas para la proteína original.

## **2. OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general del presente trabajo de tesis se centró en el análisis de la inmunogenicidad de la proteína recombinante GMOP-IFN producida en nuestro laboratorio y en el desarrollo de nuevas variantes con inmunogenicidad reducida, sin producir un impacto negativo en su estructura y función biológica. En este sentido, se realizó la identificación y optimización del contenido de epitopes T con el objetivo de encontrar un mejor candidato terapéutico en función de su antigenicidad/inmunogenicidad, pero también en base a sus parámetros farmacocinéticos y actividad biológica *in vitro*.

## **3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Para concretar el objetivo general se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- 1- Realizar un análisis *in silico* que permita identificar las regiones potencialmente inmunogénicas de la proteína y los cambios puntuales que conducirían a una reducción de la inmunogenicidad de estas regiones, sin producir un impacto negativo en la estructura y función de la proteína.
- 2- Validar las predicciones realizadas mediante técnicas experimentales, de manera tal de identificar las modificaciones que efectivamente producen un impacto en la reducción de la inmunogenicidad, y diseñar posibles variantes que las contengan, en distintas combinaciones (variantes de-inmunizadas).

- 3- Producir las variantes de-inmunizadas en células animales, purificarlas y evaluar la actividad biológica, los parámetros farmacocinéticos y la inmunogenicidad mediante ensayos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*.

# »» MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. DESARROLLO DE VARIANTES DE-INMUNIZADAS DE GMOP-IFN MEDIANTE ALGORITMOS DE PREDICCIÓN IN SILICO

Para el estudio de la inmunogenicidad de las variantes de-inmunizadas de GMOP-IFN se utilizó el conjunto de herramientas provisto por la compañía *EpiVax Inc.* (Providence, Rhode Island, Estados Unidos), institución líder y pionera en el análisis de la inmunogenicidad de proteínas con fines terapéuticos. Estas herramientas permiten modelar de forma precisa la interacción CMH-epitope y predecir la inmunogenicidad de las secuencias peptídicas.

La primera etapa del proceso de deinmunización consistió en el análisis de la inmunogenicidad global de la citoquina, por medio de una metodología previamente descrita [72]. Para esto, la secuencia de GMOP-IFN fue analizada en base a péptidos consecutivos de 9 aminoácidos de longitud y solapados en 8 residuos. El potencial inmunogénico de cada péptido fue evaluado frente a un panel de ocho alelos arquetípicos del HLA Clase II (DRB1\*0101, DRB1\*0301, DRB1\*0401, DRB1\*0701, DRB1\*0801, DRB1\*1101, DRB1\*1301 y DRB1\*1501) que representan el 90% de la diversidad de moléculas del CMH-II en la población humana mundial [121].

El *software* asigna luego un valor “Z” a cada uno de estos péptidos. Aquellos péptidos cuyo valor Z es superior a 1,64 en la escala Z de EpiMatrix (aproximadamente el 5% del set de péptidos) presentan una probabilidad significativa de unión a la molécula del CMH-II y se designan como *hits*. Los péptidos que presentan valores “Z” superiores a 2,32 en la escala (el 1% del total) presentan muy alta probabilidad de unión. La mayoría de los epitopes T publicados se encuentran dentro de esta categoría. De esta manera, EpiMatrix asigna un *score* de inmunogenicidad global a GMOP-IFN, ubicándola en una escala normalizada que permite establecer comparaciones con otras proteínas inmunogénicas.

Posteriormente, por medio de la herramienta ClustiMer, se agruparon los péptidos con mayor potencial inmunogénico en regiones (o *clusters*), de entre 15 y 25 aminoácidos [122].

Finalmente, el análisis de la contribución individual de cada aminoácido en la inmunogenicidad total de cada péptido fue llevado a cabo por medio de la herramienta OptiMatrix. Esta herramienta realiza una búsqueda de aquellos residuos críticos en la unión a los distintos alelos HLA. Luego, reemplaza en forma iterativa cada aminoácido por los 19 restantes y en cada caso realiza una evaluación de la inmunogenicidad resultante. El análisis incluye, además, un “apilamiento” de secuencias homólogas a la de interés, de manera tal de realizar cambios conservativos o naturales en la molécula. Por otra parte, los residuos esenciales desde el punto de vista de la estructura/función de IFN- $\alpha$  fueron previamente identificados mediante una minuciosa búsqueda bibliográfica [39].

Una vez establecidas las modificaciones a realizar sobre cada *clúster*, éstas fueron introducidas de manera secuencial sobre los mismos, generándose así las secuencias de las variantes de-inmunizadas correspondientes.

## 2. REACTIVOS Y SOLUCIONES

Excepto en los casos en los que se aclara expresamente, todas las soluciones acuosas fueron preparadas con agua ultra pura obtenida por ósmosis inversa (resistividad 18,2 MΩ.cm) y filtración (0,22 μm), empleando un equipo Milli Q<sup>UF</sup> (Millipore, EE. UU.). Todos los reactivos empleados fueron de grado de pureza analítica.

## 3. LÍNEAS CELULARES

**HEK 293T/17** (*Human Embryonic Kidney*) [123]: obtenida de ATCC (CRL-11268, EEUU.). Es un clon de la línea celular HEK derivada de riñón de embrión humano que expresa constitutivamente el antígeno T grande del virus de simio 40 (SV40); el clon 17 fue seleccionado específicamente por su alta transfectabilidad. Se utilizó para el ensamblado de partículas lentivirales necesarias para el proceso de transducción (sección 6.5.2).

**MDBK** (*Madin-Darby Bovine Kidney*) [124]: obtenida de la Asociación Banco Argentino de Células (ABAC, ATCC CCL-22). Es una línea celular derivada de riñón de bovino adulto normal. Presenta la característica de ser susceptible a la infección con el virus de la estomatitis vesicular (VSV). Se utilizó para la valoración biológica antiviral *in vitro* de las variantes de GMOP-IFN (sección 9.1.1).

**Daudi** [125,126]: obtenida de la colección de cultivos del *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ, Alemania; ATCC CCL-213). Es una línea celular humana derivada del linfoma de Burkitt, que se empleó para la valoración de la actividad biológica antiproliferativa *in vitro* de las variantes de GMOP-IFN (sección 9.1.2).

## 4. MEDIOS DE CULTIVO

### 4.1. Medios de cultivo para células eucariotas

La esterilización de los medios de cultivo se realizó por filtración, empleando filtros estériles con un tamaño de poro de 0,22 μm (Millipore, EE. UU.). Dos alícuotas de medio

filtrado se incubaron durante 48 h, una de ellas a TA y la otra a 37 °C, como control de la esterilidad. El medio de cultivo se conservó siempre a 4 °C.

El SFB fue previamente descomplementado por incubación en baño de agua termostatzado a 56 °C durante 30 min.

**Medio DMEM/F-12** (*Dulbecco's Modified Eagle Medium / Nutrient Mixture F-12 (Ham)*; Gibco, EE. UU.): Consistió en una mezcla 1:1 (V/V) de los medios DMEM (Gibco, EE. UU.) y Ham's F-12 (Gibco, EE. UU.) suplementados con NaHCO<sub>3</sub> (Gibco, EE. UU.) 2,441 g/l, sulfato de gentamicina (Calbiochem, EE. UU.) 0,05 mg/ml y glutamina (Gibco, EE. UU.) 1,1 g/l.

Las concentraciones de suero fetal bovino (SFB, PAA) empleadas para suplementar el medio fueron de 5% o 0,5% V/V, en función de la etapa de la experiencia en la que se haya utilizado.

Este medio se empleó para el cultivo de las líneas celulares recombinantes CHO-K1, productoras de las diferentes variantes de GMOP-IFN.

**Medio DMEM para HEK** (Invitrogen, EE. UU.): se empleó para el cultivo de la línea celular HEK 293T/17. Para ello, fue suplementado con NaHCO<sub>3</sub> 1,5 g/l, piruvato de sodio (Gibco, EE. UU.) 0,11 g/l SFB 10% (V/V) y sulfato de gentamicina 0,05 mg/ml.

**Medio MEM** (*Minimum Essential Medium*, Gibco, EE. UU.): se empleó para el crecimiento de células MDBK. Fue suplementado con glutamina 2 mM, NaHCO<sub>3</sub> 2,2 g/l, sulfato de gentamicina 0,05 mg/ml y SFB 10% (V/V) o 2% (V/V).

**Medio RPMI 1640** (*Roswell Park Memorial Institute*; Gibco, EE. UU.): se empleó para el cultivo de células mononucleares de sangre periférica (CMSP). Para preparar el medio basal se suplementó el medio RPMI 1640 con NaHCO<sub>3</sub> (Gibco, EE. UU.) 1,5 g/l y sulfato de gentamicina (Gibco, EE. UU.) 0,05 mg/ml. Para la preparación del medio de trabajo (medio completo), la formulación anterior se suplementó con SFB (PAA, Austria) al 10% (V/V), 2 mM de solución estéril de glutamina (Sigma, EE. UU.) y 1 mM de solución estéril de piruvato de sodio (Gibco, EE. UU.). El pH se ajustó a 7,2 con NaOH 4N (Sigma, EE. UU.).

#### **4.2. Medios de cultivo para células procariotas**

**Medio LB** (Luria-Bertani): se utilizó para el crecimiento bacteriano en medio líquido. Composición: triptona (Sigma, EE. UU.) 10 g/l, extracto de levadura (BD, EE. UU.) 5 g/l y NaCl (Sigma, EE. UU.) 10 g/l. El pH se ajustó a 7,2 con NaOH (Sigma, EE. UU.) 4 N. El caldo LB suplementado con ampicilina (Bagó, Argentina) 100 µg/ml se utilizó para el crecimiento de clones resistentes a dicho antibiótico.

**Medio agar LB:** se empleó para el crecimiento bacteriano en medio sólido. Consistió en medio LB con el agregado de agar (Sigma, EE. UU.) 2% (P/V). El medio agar LB suplementado con ampicilina 100 µg/ml fue empleado para la selección de clones bacterianos recombinantes. Debido a que el antibiótico es un compuesto termolábil, se adicionó al medio estéril fundido una vez que la temperatura alcanzó aproximadamente los 50 °C. Luego de homogeneizar, se repartieron alícuotas de 15 ml en placas de Petri estériles de 10 cm de diámetro (Greiner, Austria).

Medio A: se empleó para la preparación de células competentes de *E. coli*. Está constituido por medio LB suplementado con MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10 mM y glucosa 0,2% (P/V).

La esterilización de los medios de cultivo para bacterias se realizó en autoclave durante 15 min a 1 atm, a 120 °C.

## **5. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

### **5.1. Digestiones enzimáticas**

Las digestiones con endonucleasas de restricción se realizaron respetando los medios y condiciones recomendados por los proveedores de cada enzima. En todos los casos, la reacción se llevó a cabo durante 2 h a 37 °C, empleándose de 1 a 5 U de enzima por cada µg de ADN, en un volumen final de 20 µl.

Luego de las digestiones enzimáticas, los fragmentos se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa para su posterior análisis y/o purificación.

### **5.2. Electroforesis en geles de agarosa**

Las separaciones de ADN en geles de agarosa se realizaron empleando el sistema submarino [127]. Para la preparación de los geles, de concentración de agarosa 1% (P/V), se pesó la cantidad adecuada de agarosa (Biodynamics SRL, Argentina) y se disolvió en solución reguladora TAE (Tris-Acetato 40 mM pH 8, Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM) en horno microondas. La solución se enfrió a 60 °C y se adicionó el colorante SYBR® *Safe DNA gel stain* 10000 X (Invitrogen, EE. UU.). Esta solución se colocó en un soporte adecuado y se introdujo un peine de 1 mm de espesor para formar los carriles de siembra, que se retiró una vez solidificado. El gel se colocó en una cuba electroforética y se cubrió completamente con solución TAE. Las muestras de ADN se mezclaron con solución de siembra 10 X [Glicerol (Cicarelli, Argentina) 30% (V/V); azul de bromofenol 0,25% (P/V)] y cuidadosamente se sembraron en cada una de las calles del gel. Se aplicó un voltaje entre 80-100 V hasta observar la adecuada migración del colorante de la



solución de siembra. Finalmente, los geles fueron examinados utilizando un transiluminador *Safe Imager™* (Invitrogen, EE. UU.) y fotografiados.

La detección de los fragmentos de ADN por medio de esta técnica es posible debido al fenómeno conocido como transferencia de energía mediante resonancia de fluorescencia. El fundamento del mismo se basa en la capacidad del colorante SYBR® de intercalarse en la estructura secundaria de la doble hélice del ADN y acoplarse energéticamente a los ácidos nucleicos que lo forman, de manera que su tasa de emisión fluorescente se incrementa notablemente. El complejo resultante ADN-SYBR presenta el pico de absorción a  $\lambda=498$  nm y el pico de emisión a  $\lambda=522$  nm (correspondiente a la zona verde del espectro). Para estimar la longitud de los fragmentos de ADN separados se empleó el marcador de masa molecular *Trans2K PlusII DNA Marker* (Sigma, EE. UU.).

### **5.3. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa**

Los fragmentos de ADN separados por electroforesis en geles de agarosa se purificaron utilizando el *kit* comercial *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN, Alemania), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

La purificación se verificó analizando una alícuota mediante electroforesis en gel de agarosa. Se determinó la pureza y la concentración de los fragmentos mediante lectura espectrofotométrica (sección 5.9).

### **5.4. Purificación mediante precipitación de los fragmentos de ADN digeridos por endonucleasas**

Los fragmentos de ADN obtenidos luego de las digestiones con enzimas de restricción fueron aislados y concentrados mediante precipitación con etanol absoluto. De esta manera fue posible eliminar los fragmentos cortos de ADN liberados, las sales y las enzimas de restricción.

Para esto, la muestra se llevó a volumen final de 250  $\mu$ l con agua MiliQ autoclavada, adicionando un volumen de acetato de sodio 3 M equivalente al 10% del volumen de la muestra. Se agitó y se agregaron 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío, incubando a  $-70$  °C durante 1 h. Luego, se centrifugó a 13000 x *g* durante 15 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se lavó con 200  $\mu$ l de etanol 70% frío mediante centrifugación a 13000 x *g*, durante 7 min a 4 °C. Se secó en estufa a 37 °C durante 10 min y el precipitado de ADN se resuspendió en un volumen de 50  $\mu$ l de agua Milli Q autoclavada.

### 5.5. Reacciones de ligación de ADN

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo en un volumen de 20  $\mu$ l, utilizando la enzima T4 ADN ligasa (Invitrogen, EE. UU.) según el protocolo indicado por el proveedor. Para la ligación de insertos con el vector pLV-pLK se utilizó una relación inserto/plásmido 5:1. La mezcla de reacción se incubó durante toda la noche a 4 °C. Se realizó un control de plásmido religado, reemplazando el volumen correspondiente al inserto por agua autoclavada.

### 5.6. Preparación de células competentes

Para la preparación de células competentes se realizó una estría de *Escherichia coli* TOP10, obtenidas de un stock conservado a -70 °C, sobre una placa con agar LB. Se cultivaron durante 16-20 h a 37 °C. Se escogió al azar una de las colonias desarrolladas y se inoculó en 5 ml de caldo LB (cultivo inóculo), realizándose una nueva incubación a 37 °C durante 18 h con agitación a 180 rpm. Se realizó un repique del cultivo en una dilución 1:100 en 100 ml de medio A y se incubó a 37 °C en agitación a 180 rpm durante 2 h. Posteriormente, las células fueron trasvasadas asépticamente a un tubo de centrifuga estéril, enfriado previamente, e incubadas durante 15 min en baño de hielo. Las bacterias se cosecharon mediante centrifugación a 4 °C y 1500 rpm durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 1 ml de medio A frío. A esta suspensión se le adicionaron 5 ml de solución de conservación [medio LB conteniendo glicerol 36% (P/V); PEG 12% (P/V) (MW7500); MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 12 mM, esterilizado por filtración con membrana de 0,22  $\mu$ m] y se mezcló suavemente. Finalmente, la suspensión celular fue dispensada en alícuotas de 50  $\mu$ l en criotubos fríos (Greiner, Austria), los cuales fueron conservados a -70 °C hasta su utilización. El medio de cultivo utilizado para la preparación de las células competentes, rico en nutrientes, favorece la generación de poros en la pared celular bacteriana y, en consecuencia, la introducción del ADN plasmídico durante la transformación. La triptona y el extracto de levadura aportan el nitrógeno y los factores de crecimiento necesarios para la replicación y recuperación bacteriana luego del proceso de transformación. La glucosa incrementa la tasa de crecimiento y el sulfato de magnesio provee los iones Mg<sup>2+</sup> necesarios para las reacciones enzimáticas que permiten la replicación del ADN y eleva la eficiencia de transformación.

Para asegurar la esterilidad del cultivo y estimar la eficiencia de transformación se realizó un control de las células competentes preparadas. Para ello, las bacterias competentes, una vez conservadas durante al menos 16 h a -70 °C, se descongelaron 2 criotubos: uno de ellos se transformó con 100 ng de un vector con resistencia para ampicilina (control positivo) y el otro fue sometido al mismo procedimiento, pero sin el agregado de ADN (control negativo).

Finalizada la transformación, las células fueron distribuidas homogéneamente en placas de cultivo conteniendo agar LB y antibiótico ampicilina. Las células competentes fueron utilizadas sólo cuando la placa del control negativo no mostró desarrollo de colonias y cuando se obtuvo una eficiencia de transformación superior a  $10^6$  UFC/ $\mu$ g de ADN en el control positivo.

### **5.7. Transformación de células competentes**

Para realizar la transformación bacteriana se descongelaron 50  $\mu$ l de células competentes y se mezclaron con el ADN (mezcla de ligación, sección 5.5, o plásmido control), incubando durante 30 min en baño de hielo. Posteriormente, la mezcla se colocó en un baño a 42 °C durante 2 min y se transfirió inmediatamente a hielo durante otros 2 min. Se adicionaron 700  $\mu$ l de medio LB (sin antibiótico) y se incubó durante 60 min a 37 °C con agitación a 180 rpm, con el propósito de permitir la recuperación de las bacterias de la situación de estrés a la cual fueron sometidas. Las células se cosecharon mediante centrifugación a 2500 x *g* durante 5 min a temperatura ambiente, se descartaron 600  $\mu$ l de sobrenadante y el sedimento se resuspendió en el volumen remanente de medio. Finalmente, la totalidad de la suspensión celular se distribuyó en forma homogénea sobre una placa conteniendo agar LB suplementado con ampicilina, que permite seleccionar las bacterias transformadas. Se incubó durante 16 h a 37 °C.

### **5.8. Preparación de ADN plasmídico**

#### **5.8.1. Minipreparación**

Con el propósito de obtener los vectores lentivirales que contengan las secuencias codificantes de las variantes de GMOP-IFN con una pureza y concentración adecuadas para realizar su secuenciación, se realizó una extracción plasmídica en pequeña escala.

A partir de colonias individuales de cultivos realizados en medio agar LB con antibiótico, se inocularon frascos conteniendo 5 ml de LB con antibiótico y se dejaron crecer durante 16-20 h a 37 °C y en agitación a 180 rpm. Luego, el vector fue purificado utilizando el kit comercial *Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system* (Promega, EE. UU.), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

#### **5.8.2. Maxipreparación**

Con el propósito de obtener cantidades suficientes de los vectores lentivirales para su empleo en el procedimiento de transfección de células eucariotas, se realizaron preparaciones de ADN plasmídico en gran escala (maxiprep), empleando el método de lisis alcalina [128].

Inicialmente se realizó una estría de la cepa conteniendo el plásmido de interés sobre una placa de agar LB y se cultivó durante toda la noche en estufa a 37 °C. Se tomó una colonia aislada y se la cultivó en 10 ml de medio LB líquido suplementado con ampicilina durante 16 h a 37 °C en agitación a 180 rpm. Se agregó a este pre-cultivo 90 ml de medio LB con antibiótico y se mantuvo en agitación durante 8 h en las mismas condiciones. Posteriormente, se amplificó el cultivo a un frasco Erlenmeyer conteniendo 200 ml de medio LB y se incubó durante 16-20 h en las mismas condiciones.

Los cultivos se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 10 ml de solución I [Tris-HCl 25 mM pH 8,3; Na<sub>2</sub>EDTA 10 mM; glucosa 1% (V/V)], incubándose durante 5 min en hielo. Se adicionaron 20 ml de solución II [NaOH 0,2 M; SDS 1% (V/V)] homogeneizando adecuadamente para lograr la lisis celular en hielo durante 5 min. Se agregaron 15 ml de solución III o solución de neutralización [K<sup>+</sup> 3 M, Ac<sup>-</sup> 5 M], a 4 °C, homogeneizando. Se incubó durante 5 min en hielo y se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se filtró a través de un papel de filtro y el ADN plasmídico se precipitó mediante el agregado de 0,6 volúmenes de isopropanol (J.T. Baker, EE. UU.), incubando 15 min a -70 °C. Se centrifugó a 5000 rpm durante 20 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 ml de solución IV [etanol 80% (V/V); Tris-HCl 10 mM pH 8; NaCl 100 mM]. La suspensión se trasvasó a un tubo cónico de 1,5 ml y se centrifugó a 14000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente. El *pellet* se resuspendió en 1 ml de LiCl 2 M, dejando en hielo durante 1 h con el propósito de precipitar el ARN.

La solución se centrifugó 2 min a 14000 rpm y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo donde se realizó una extracción con fenol/cloroformo 1:1 (V/V), empleándose 250 µl de cada reactivo. Se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min y se conservó la fase acuosa (superior). A ésta se le adicionó 1 volumen de isopropanol, se agitó y se incubó durante 20 min a -70 °C para precipitar el ADN. Se centrifugó a 14000 rpm durante 15 min a 4 °C y el precipitado se lavó con 100 µl de solución IV centrifugando durante 5 min a 14000 rpm. El precipitado se disolvió en 500 µl de solución TE [Tris-HCl 25 mM pH 8,3; NaCl 100 mM] con el agregado de ARNasa (Promega, EE. UU.) 100 µg/ml. Se incubó 1 h a 37 °C para eliminar restos de ARN.

Se repitió la extracción fenol/cloroformo para eliminar la ARNasa adicionada. El ADN presente en la fase acuosa se precipitó mediante el agregado de 50 µl de NaAc 3 M pH 7 y 0,6

volúmenes de isopropanol, se agitó y se incubó 20 min a -70 °C, con el fin de precipitar el ADN plasmídico. Se centrifugó a 14000 rpm durante 15 min a 4 °C. El precipitado se lavó con 100 µl de solución IV y se dejó secar a 37 °C en estufa. Finalmente, se resuspendió con 300 µl de agua Milli Q estéril.

Finalmente, se evaluó la integridad de los plásmidos mediante electroforesis en gel de agarosa (sección 5.2) y se determinó la concentración y pureza mediante lectura de absorbancia a longitudes de onda de 260 nm y 280 nm (sección 5.9).

### **5.9. Determinación de la concentración y pureza del ADN**

Los ácidos nucleicos absorben luz ultravioleta debido a la presencia de bases aromáticas nitrogenadas a lo largo de las cadenas del ADN. Ésta es una característica propia de la molécula que presenta un máximo de absorción a una longitud de onda de 260 nm. A esta longitud de onda la absorción es proporcional a su concentración. Una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a una concentración de 50 µg/ml de ADN doble cadena (ADNdc).

La concentración y pureza de los plásmidos (Concentración de ácido nucleico,  $C_{an}$ ) se determinó por medida de su absorbancia a  $\lambda=260$  nm y  $\lambda=280$  nm en espectrofotómetro UV-visible (Ultrospec2100pro Healthcare, Reino Unido), según las ecuaciones 1 y 2 [128].

$$C_{an} (\mu g/ml) = A_{260nm} * f \left( \frac{\mu g}{ml.DO} \right) Dil^{-1} \quad (1)$$

$$Pureza = \frac{A_{260nm}}{A_{280nm}} \quad (2)$$

En la ecuación (1) el valor de f es igual a 50 µg/ml.DO para ADN. El valor de pureza de la ecuación (2) debe estar comprendido en el rango de 1,8 a 2,0. Por fuera del mismo, la solución no es considerada apta para su uso en transfección de células eucariotas, ya que posee una cantidad considerable de contaminantes (proteínas, reactivos utilizados en la extracción, entre otros) que podrían afectar la eficiencia de la misma.

### **5.10. Construcción de los plásmidos pLV-PLK conteniendo las variantes de GMOP-IFN**

Los vectores lentivirales conteniendo cada una de las variantes de GMOP-IFN fueron generados mediante el clonado de las secuencias correspondientes (contenidas inicialmente en plásmidos pUC57-Kan) en vectores pLV-PLK. Estos últimos poseen las siguientes características:

- » un origen de replicación bacteriano (ORI);

- » un gen que otorga resistencia a ampicilina;
- » un sitio de múltiple clonado, corriente abajo del promotor temprano de citomegalovirus (CMV);
- » un gen que codifica para la enzima puromicina N-acetiltransferasa dirigido por el promotor SV40, para la selección de células eucariotas con el antibiótico puromicina;
- » la presencia de una región RRE, altamente estructurada, que actúa como sitio de unión de la proteína Rev, la cual permite el transporte de los ARNs sin procesar o parcialmente procesados desde el núcleo al citoplasma;
- » una región PBS (sitio de unión de cebadores), que actúa como cebador para la transcriptasa reversa, en el momento de iniciar la síntesis de la hebra (-) del ADN viral;
- » la secuencia cPPT (segmento polipurina central), que actúa como cebador de la hebra (+) en la síntesis del ADN viral;
- » un elemento regulatorio postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (WPRE);
- » una señal de empaquetamiento ( $\Psi$ ), secuencia corta y altamente estructurada requerida para la incorporación del ARN genómico en el interior de las partículas virales.

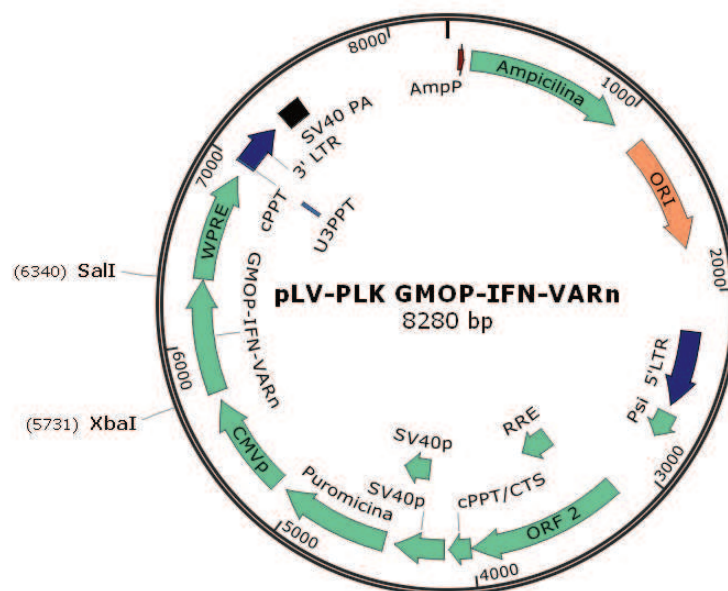
Todas las regiones necesarias para la generación de los vectores lentivirales se encuentran comprendidas entre las repeticiones terminales largas (5' LTR y 3' LTR).

Con el objetivo de realizar el clonado de las secuencias de las diferentes variantes de GMOP-IFN en los vectores pLV-PLK, se transformaron células competentes (sección 5.7) con los plásmidos conteniendo los productos de síntesis obtenidos de la empresa GENEWIZ. Las bacterias transformadas fueron sembradas en placas conteniendo medio LB-agar suplementado con kanamicina, de manera que sólo crezcan aquellas que incorporaron el plásmido. Se eligieron al azar dos clones por cada variante, se realizó minipreparación de ADN (sección 5.8.1) y posterior digestión con las enzimas de restricción *Xba*I y *Sa*II, para liberar el inserto correspondiente. Los productos de digestión se analizaron en un gel de agarosa, a partir del cual se purificaron las bandas correspondientes a los fragmentos codificantes para las moléculas de GMOP-IFN con sus respectivos péptidos de señalización (623 pb). Al mismo tiempo, se realizó la digestión del plásmido pLV-PLK con las mismas enzimas de restricción (*Xba*I y *Sa*II) y se purificó mediante precipitación con etanol absoluto (sección 5.4). Las concentraciones del vector y de los fragmentos digeridos y purificados se determinaron por

lectura espectrofotométrica (sección 5.9). Ambos productos fueron empleados para realizar la reacción de ligación (sección 5.5) que se utilizó para la posterior transformación bacteriana.

Las bacterias transformadas fueron sembradas en placas conteniendo medio LB-agar suplementado con ampicilina como agente de selección. A partir de cada placa se realizó un ensayo de PCR en colonia para 2 clones bacterianos, empleando los oligonucleótidos LV-rev (5'-ATAGCATGATACAAAGGCAT-3') y CMV-Fw (5'-CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3'), que permiten amplificar un fragmento de aproximadamente 650 pb que contiene la secuencia completa de cada una de las variantes de GMOP-IFN.

Por último, se realizó la secuenciación automática del ADN plasmídico de los clones positivos (solicitado a la empresa Macrogen, Corea del Sur) a fin de asegurar una correcta secuencia génica de las variantes, que permita su empleo en las etapas posteriores del proceso. Para esto se emplearon los oligonucleótidos LV-rev y CMV-Fw.



**Figura 8.** Representación esquemática del vector pLV-PLK. Los vectores lentivirales portadores de las secuencias de las variantes de GMOP-IFN (GMOP-IFN-VARn) fueron generados mediante clonado de los insertos, originalmente contenidos en plásmidos pUC57-Kan, en los sitios *XbaI/SalI* del vector pLV-PLK.

A partir de las bacterias transformadas con los vectores pLV-PLK-GMOP-IFN-(VAR1-VAR4) (Figura 8), se realizaron maxipreparaciones de modo de obtener una cantidad adecuada de ADN plasmídico que permita llevar a cabo el proceso de transfección (sección 6.5.1). Se corroboró la liberación del inserto y la integridad del ADN plasmídico de las preparaciones mediante digestiones y electroforesis en geles de agarosa y se conservaron a -20 °C hasta su empleo.

### **5.11. Criopreservación de células bacterianas**

Para la conservación de bacterias se procedió a cultivarlas durante 18 h a 37 °C en medio LB (cepas no transformadas) o medio LB suplementado con ampicilina (cepas recombinantes). Posteriormente, se tomaron 800 µl del cultivo y se adicionaron 200 µl de glicerol 50% (V/V) estéril (Cicarelli, Argentina), homogeneizando para asegurar su distribución. Finalmente, fueron conservadas a -70 °C en criotubos.

### **5.12. Revitalización de cepas bacterianas**

Para recuperar las bacterias congeladas se obtuvo una pequeña porción de material criopreservado y se inoculó en medio LB o medio LB-antibiótico para bacterias recombinantes. Luego, el criotubo se conservó nuevamente a -70°C y el tubo inoculado se incubó a 37 °C durante 16 h.

## **6. TÉCNICAS DE CULTIVO DE CÉLULAS ANIMALES**

### **6.1. Condiciones de cultivo de células eucariotas**

El cultivo de las células se realizó, en todos los casos, en las condiciones estándar para células animales: estufa gaseada (Nuair e, EE. UU.) a 37 °C, atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y saturada de humedad.

#### **6.1.1. Cultivo de células adherentes**

Para el cultivo en adherencia de las líneas de células CHO-K1 recombinantes productoras de las diferentes variantes de GMOP-IFN y de las células MDBK, se emplearon frascos T triples (Nunc, ThermoFisher, EE. UU.) de 500 cm<sup>2</sup> de superficie, manteniendo una relación constante de 0,4 ml de medio de cultivo por cada cm<sup>2</sup> de superficie, de acuerdo con lo establecido por Freshney [129].

Los cultivos que crecen adhiriéndose a una superficie sólida (sustrato) forman una monocapa. Para realizar sub-cultivos se requiere el uso de proteasas con el fin de liberar las células del sustrato sobre el que se encuentran ancladas. Para tal fin, se procedió a retirar el sobrenadante de cultivo y lavar la monocapa con una solución de tripsina-EDTA, compuesta por tripsina (Gibco, EE. UU.) 0,05% (P/V) y Na<sub>2</sub>EDTA (Gibco, EE. UU.) 0,02% (P/V) en solución reguladora de fosfato salino [PBS: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma, EE. UU.) 0,6 g/l; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma, EE. UU.) 0,78 g/l; NaCl 8,8 g/l; pH 7,4] durante 15 s a temperatura ambiente, con el fin de neutralizar la



acción de factores antitripsina presentes en el SFB. Se respetó una relación de 20  $\mu\text{l}$  de solución de tripsina-EDTA por cada  $\text{cm}^2$  de superficie. Luego de eliminar la solución de lavado, se agregó nuevamente la misma proporción de la solución de tripsina-EDTA, dejándola actuar el tiempo necesario hasta lograr el desprendimiento completo de las células adheridas. El proceso de desorción de las células fue controlado por observación al microscopio, y cuando las células estuvieron despegadas (verificado por su forma redondeada) se homogeneizó la suspensión cuidadosamente con pipeta durante unos segundos. Posteriormente, se adicionó el medio de cultivo suplementado con SFB para neutralizar la acción de la tripsina y se homogeneizó la suspensión celular. Se tomó una alícuota para su recuento y con este resultado se realizó la dilución correspondiente con medio de cultivo fresco.

### **6.1.2. Cultivo de células en suspensión**

Los sistemas empleados para el cultivo en suspensión de las CMSP, fueron placas multipozo (MW) de poliestireno (Greiner, Austria) de 6 y 48 pozos con una superficie de 9,6 y 1  $\text{cm}^2$  por pozo, respectivamente. La línea celular Daudi se cultivó utilizando frascos T de 25  $\text{cm}^2$  de superficie. De la misma manera que al realizar el cultivo de células en adherencia, se mantuvo la relación de 0,4 ml de medio de cultivo por  $\text{cm}^2$  de superficie.

Para realizar los cambios de medio, las suspensiones celulares se centrifugaron 20 min a 200 x *g* en una centrífuga Eppendorf 5403, rotor 16A4-44. Se descartó el sobrenadante de cultivo y los *pellets* celulares se resuspendieron en el medio fresco correspondiente.

### **6.2. Determinación de la concentración celular**

Todos los recuentos celulares se realizaron en cámara de Neubauer, excluyendo del recuento aquellas células apoptóticas y muertas por el método de exclusión con azul de tripán (Gibco, EE. UU.).[130] Esta técnica se basa en el hecho de que las células viables no captan ciertos colorantes, a diferencia de las células apoptóticas y muertas, cuya membrana plasmática se encuentra alterada, permitiendo el ingreso del colorante al citoplasma.

Para realizar el recuento, una alícuota de la suspensión celular se incubó durante 1 min con una solución de azul de tripán 0,4% (V/V) en PBS y posteriormente se sembró en la cámara de recuento, empleando diluciones convenientes de acuerdo con la densidad celular esperada de la muestra. Al realizar los recuentos de las células CHO-K1 se contaron las células viables (refringentes) y las muertas (azules) contenidas en cada uno de los cuadrantes de los extremos (Nº de células contadas).

La concentración de células viables o muertas (X) se determinó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$X \left( \frac{\text{cél}}{\text{ml}} \right) = \frac{N(\text{cél})}{4} D 1.10^4(\text{ml}^{-1}) \quad (3)$$

Donde N es el número de células contadas y D es la inversa de la dilución ( $D=1/d$ ).

La viabilidad del cultivo se determinó calculando el porcentaje de células viables con respecto a las totales, de acuerdo a la expresión:

$$\text{Viabilidad (\%)} = \frac{x_V}{x_T} * 100 \quad (4)$$

Donde la concentración de células totales ( $X_T$ ) es igual a la suma de las concentraciones de células muertas ( $X_M$ ) y viables ( $X_V$ ).

### **6.3. Criopreservación de líneas celulares animales**

Cuando se ha obtenido una línea celular con las características deseadas y libre de contaminación, es esencial su adecuada conservación. La criopreservación constituye un método eficaz de conservación de células que garantiza el mantenimiento de sus propiedades metabólicas y funcionales iniciales [131].

El daño celular inducido por el congelamiento y descongelamiento es causado por la formación de cristales de hielo intracelulares y por efectos osmóticos [132]. La adición de un agente crioprotector, como el glicerol o el dimetil sulfóxido (DMSO) [133], y el empleo de una velocidad lenta de enfriamiento, aproximadamente 1 °C/min [134], minimizan dichos efectos.

La conservación de las CMSP se realizó en nitrógeno líquido, ya que a temperaturas de -196 °C se observan deterioros celulares mínimos [135]. Se empleó una técnica de enfriamiento gradual desde temperatura ambiente hasta -196 °C. Para ello, una vez realizado el recuento, suspensiones celulares de densidad adecuada y en fase de crecimiento exponencial se centrifugaron a 200 x g durante 5 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en una solución de SFB y DMSO (Sigma, EE. UU.) en una relación 9:1 (V/V), de manera de obtener una concentración de  $1,5 \cdot 10^7$  células viables/ml. La suspensión celular se distribuyó a razón de 1 ml por criotubo (Greiner, Austria). Estos criotubos fueron guardados en un contenedor comercial apropiado, MrFrosty (Nalgene, EE. UU.), y llevados a freezer de -80 °C por 24 h. El dispositivo contenedor tiene en su interior alcohol isopropílico, que permite que dentro del MrFrosty la temperatura disminuya a razón de 1 °C/min. De esta forma se logra un enfriamiento gradual de la suspensión celular, dando

lugar a una correcta revitalización de las mismas cuando así se desee. Finalmente, los criotubos se almacenaron en termos de N<sub>2</sub> líquido a -196 °C.

#### **6.4. Descongelamiento de líneas celulares animales**

La descongelación rápida de la suspensión celular es esencial para su óptima recuperación. Para la revitalización de las líneas celulares criopreservadas se retiró el criotubo del termo de N<sub>2</sub> líquido y se lo sumergió rápidamente en un baño de agua a 37 °C. La suspensión celular descongelada se transfirió a un tubo cónico conteniendo 30 ml de medio de cultivo basal y se centrifugó a 200 x *g* durante 5 min a temperatura ambiente. Esta etapa se realizó con el objeto de diluir rápidamente el DMSO y luego eliminarlo, ya que es un reactivo tóxico para las células en cultivo. Se descartó el sobrenadante y el sedimento de células se resuspendió en un volumen de medio de cultivo adecuado. Finalmente, se realizó el recuento celular para evaluar la concentración y la viabilidad celular (sección 6.2).

#### **6.5. Generación de las líneas celulares productoras de las variantes de GMOP-IFN**

##### **6.5.1. Producción de partículas lentivirales mediante transfección de células HEK-293T/17**

Los vectores derivados de la familia Retroviridae (vectores retrovirales), entre ellos los lentivirales, son de especial interés porque convierten sus genomas de ARN en ADN y los integran en los cromosomas de las células blanco [136,137]. Gran parte de los vectores lentivirales conocidos se han construido a partir del conocimiento sobre el genoma del virus HIV-1 y posteriormente han sido mejorados con el fin de optimizar su seguridad e infectividad, constituyendo vectores de segunda y tercera generación [138]. Estos vectores poseen la capacidad de transferir elementos genéticos complejos, tales como secuencias policistrónicas o intrones, presentan un perfil de sitios de integración potencialmente seguro y un sistema relativamente sencillo para la manipulación y producción del vector.

En particular, los vectores lentivirales de tercera generación empleados en este trabajo, poseen las siguientes propiedades:

- » Están pseudotipados con la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G). Esta proteína presenta una mayor estabilidad que la glicoproteína de envoltura del HIV-1 y además incrementa el tropismo del vector, permitiendo así la transducción de un conjunto de células marcadamente mayor, incluso células no animales.

- » No poseen determinadas proteínas virales accesorias (Vif, Vpu, Vpr o Nef) que son esenciales para una eficiente propagación y virulencia del HIV-1 en células primarias o *in vivo*.
- » Presentan deleciones clave en su genoma que resultan en una inactivación transcripcional de los genomas virales potencialmente empaquetables en la célula transducida.
- » El promotor natural del HIV-1 es remplazado por secuencias promotoras heterólogas.

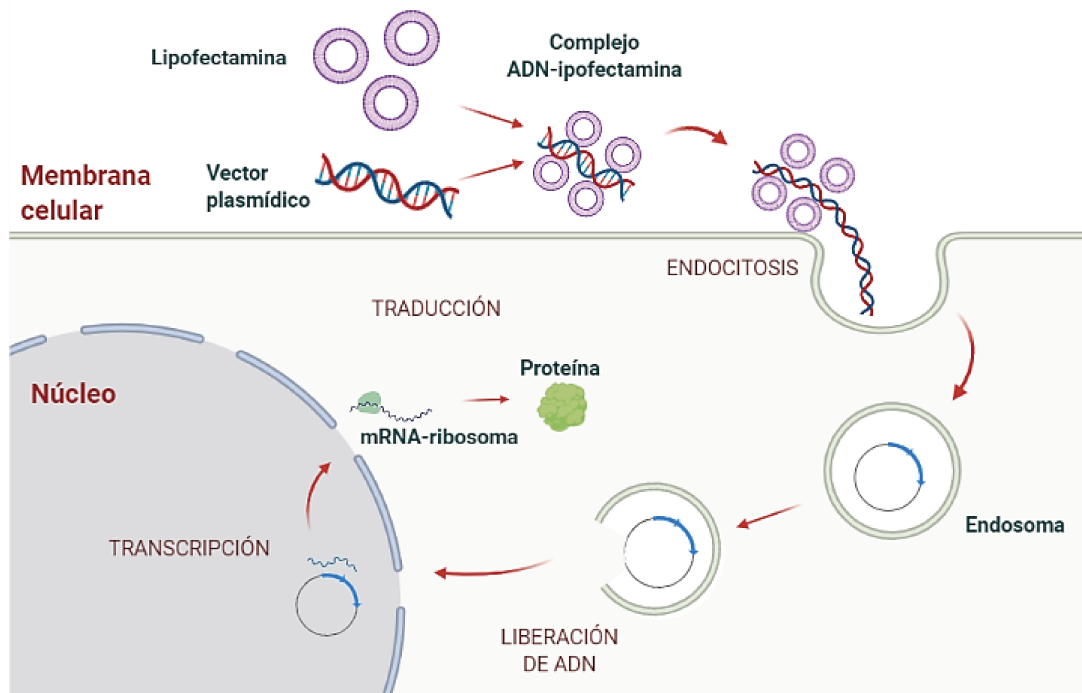
Para su construcción, se emplea una estrategia de co-transfección de células HEK-293T/17 con cuatro plásmidos que codifican las proteínas anteriormente mencionadas. Puesto que los elementos del vector se encuentran distribuidos en cuatro plásmidos diferentes, se requieren al menos tres eventos de recombinación para generar virus similares al HIV-1 con capacidad replicativa; y si esto ocurriera, las partículas generadas tendrían sólo tres de los nueve genes del HIV-1. De esta manera, la manipulación de estos vectores contempla un nivel adecuado de bioseguridad.

En el presente trabajo, las partículas lentivirales utilizadas en el proceso de transducción fueron generadas mediante co-transfección de células de la línea HEK-293T/17 con los siguientes cuatro plásmidos:

1. pREV, expresado durante el empaquetamiento para inducir la exportación nuclear del vector de transferencia;
2. pVSV-G, que codifica la proteína G de envoltura del VSV, necesaria para la entrada de la partícula lentiviral en la célula;
3. pMDL, que codifica las proteínas de matriz y cápside, expresadas como poliproteína gag, capaz de empaquetar el vector de expresión, y poliproteína pol, que da lugar a una proteasa, una transcriptasa reversa y una integrasa, requeridas para el clivaje de los elementos estructurales y para el procesamiento del genoma-vector durante el proceso de integración al genoma celular;
4. plásmido de transferencia pLV-PLK, que codifica la proteína de interés (variantes de GMOP-IFN) y confiere a las células resistencia a puromicina.

Para la co-transfección se utilizó la técnica de lipofección con lípidos catiónicos [139], utilizando en este caso el reactivo comercial Lipofectamina 2000™ (Invitrogen, EE. UU.). En soluciones acuosas, los lípidos catiónicos forman pequeñas vesículas unilaminares (liposomas) cargadas positivamente que interactúan con las cargas negativas del ADN formando complejos. Éstos a su vez presentan elevada afinidad por las membranas citoplasmáticas y

pueden ser incorporadas por vía endocítica al interior de las células. Debido a que los complejos ADN/lipofectamina evitan la vía lisosomal, el ADN no se ve afectado. De esta manera, la lipofección constituye una técnica simple y apropiada para transfecciones transitorias y estables de muchos tipos de líneas celulares. En la Figura 9 se muestra una representación gráfica del fundamento del método de transfección descrito.



**Figura 9.** Representación esquemática del proceso de transfección por medio de la técnica de lipofección con lípidos catiónicos.

El protocolo empleado consistió en cultivar las células HEK-293T/17 a una densidad de  $4 \cdot 10^5$  cél/ml en placas de 10 cm de diámetro (Greiner, Austria), empleando medio DMEM para HEK suplementado con SFB 10% (V/V). Luego de 24 h de incubación, se llevó adelante el procedimiento de lipofección, para lo cual se prepararon 2,5 ml de medio DMEM para HEK sin SFB conteniendo 2,5  $\mu$ g de pREV; 3,6  $\mu$ g de pVSV-G; 6,5  $\mu$ g pMDL y 10  $\mu$ g del plásmido de transferencia. Por otro lado, se mezclaron 2,5 ml de medio DMEM para HEK sin SFB con 50  $\mu$ l de Lipofectamina 2000™ (Invitrogen, EE. UU.; 1 mg/ml). El contenido de ambos tubos cónicos se mezcló gota a gota para favorecer la formación homogénea de los complejos lípido-ADN. Posteriormente se retiró el sobrenadante de las placas de cultivo conteniendo las células HEK-293T/17 y se adicionó el volumen de 5 ml de la mezcla lípido-ADN. Luego se incubó en las mismas condiciones de cultivo durante al menos 4 h. Al cabo de este tiempo, el cultivo se suplementó con 5 ml de medio DMEM para HEK SFB 20% (V/V), de modo de obtener una concentración final de SFB de 10% (V/V).

Luego de 48 h postransfección se cosechó el sobrenadante del cultivo conteniendo las partículas lentivirales y se centrifugó a  $100 \times g$  durante 8 min a temperatura ambiente para eliminar las células que pudieran haberse desprendido de la monocapa al retirar el medio de cultivo. El sobrenadante de la centrifugación se fraccionó en microtubos (1 ml) y se almacenó a  $-70 \text{ }^\circ\text{C}$  hasta su utilización, asegurando así el mantenimiento del título viral y de la actividad.

Todos los vectores de empaquetamiento fueron generados y preparados previamente en el laboratorio.

### **6.5.2. Transducción de células CHO-K1**

Con el objetivo de obtener líneas celulares estables productoras de las variantes de GMOP-IFN, se llevaron a cabo transducciones de células CHO-K1, empleando partículas lentivirales conteniendo los genes de interés. Esta técnica constituye un proceso altamente eficiente en el cual el transgen se integra establemente en el genoma de las células en estado de división y no división.

Para realizar la transducción, las células CHO-K1 se cultivaron en placas de 6 pozos a una densidad de  $3.10^4$  cél/ml en medio DMEM/F-12 suplementado con SFB 5% (V/V). Transcurridas 24 h, se removió el sobrenadante de cultivo y se adicionó 1 ml de la cosecha de partículas lentivirales. Se incubaron las células en estas condiciones durante otras 24 h y posteriormente el medio conteniendo las partículas lentivirales fue removido y remplazado por 3 ml de medio DMEM/F-12 suplementado con SFB 5% (V/V).

Luego de 72 h, las células transducidas se subcultivaron para continuar con las siguientes etapas del proceso.

### **6.6. Presión de selección con antibiótico de las líneas celulares productoras de las variantes de GMOP-IFN**

Las células CHO-K1 transducidas fueron sometidas a un proceso de presión selectiva con concentraciones crecientes del antibiótico puromicina, de manera de enriquecer el cultivo con aquellas células que presentan una mayor expresión de las proteínas de interés.

El proceso consistió en sembrar las células a una densidad de  $2.10^5$  cél/ml, empleando medio DMEM/F-12 suplementado con SFB 5% (V/V) y conteniendo una determinada cantidad de antibiótico. Se comenzó la presión con una concentración de puromicina de  $10 \text{ } \mu\text{g/ml}$ , analizando posteriormente el crecimiento celular y las concentraciones de IFN en el sobrenadante de cultivo. De acuerdo a los resultados obtenidos, se continuó con la selección empleando  $20 \text{ } \mu\text{g/ml}$  de puromicina. El incremento gradual de antibiótico se extendió hasta

observar la muerte de los cultivos celulares o bien, una disminución de la productividad celular específica.

Al finalizar la presión de selección, se retiró el medio de cultivo y se reemplazó por medio sin antibiótico para permitir la recuperación de las células que permanecieron viables. Éstas se mantuvieron en cultivo hasta alcanzar la confluencia, procediéndose luego a su criopreservación (sección 6.3).

## **7. PRODUCCIÓN DE LAS VARIANTES DE GMOP-IFN**

La producción de las diferentes proteínas a una escala mayor, con el objetivo de obtener la cantidad necesaria de cada variante para la realización de los ensayos de caracterización posteriores, se realizó en condiciones de adherencia empleando frascos T de 125 cm<sup>2</sup> de superficie. Las líneas celulares obtenidas luego de la presión con 150 µg/ml de puromicina se inocularon a una concentración de 2.10<sup>5</sup> cél/ml en medio de cultivo DMEM/F-12 suplementado con SFB 5% (V/V). Cuando las células alcanzaron la fase estacionaria, se cosechó el sobrenadante de cultivo cada 48 h o 72 h, reemplazándolo por medio de cultivo DMEM/F-12 suplementado con SFB 0,5% (V/V). La reducción del porcentaje de SFB respecto al medio de crecimiento se realizó para facilitar la posterior purificación de las proteínas de interés, siendo a la vez suficiente para asegurar la correcta adhesión de las células al sustrato.

Los sobrenadantes de cultivo fueron centrifugados durante 10 min a 200 x *g* y conservados a -20 °C para su posterior purificación. Este procedimiento se repitió hasta obtener 12 cosechas de cada variante.

Se tomó una alícuota de cada cosecha para analizar la concentración de cada variante de GMOP-IFN mediante ELISA sándwich (sección 7.1).

### **7.1. Cuantificación de las variantes de GMOP-IFN en sobrenadantes de cultivo mediante ELISA sándwich**

Para realizar la cuantificación de las diferentes variantes de GMOP-IFN presentes en las cosechas se empleó el método de ELISA sándwich propuesto por Ceaglio [42]. Como anticuerpo de captura se utilizó el anticuerpo monoclonal (mAb) CA5E6 obtenido previamente en el laboratorio. Además, como anticuerpo de detección se empleó un suero policlonal (pAb) de conejo anti-rhIFN-α2b (suero C7). Todos los reactivos disponibles en el laboratorio fueron obtenidos empleando el rhIFN-α2b de origen bacteriano (rhIFN-α2b no glicosilado, Gema Biotech, Argentina) como inmunógeno.

Todas las incubaciones se llevaron a cabo en cámara húmeda. Después de cada etapa se realizaron seis lavados con solución de PBS con el agregado de Tween 20 (Bio Basic, Canadá) al 0,05% (V/V) (solución de lavado).

El ensayo de ELISA sándwich se basó en la captura de las distintas variantes de GMOP-IFN por parte del mAb CA5E6 inmovilizado sobre placas de poliestireno y su posterior reconocimiento por las inmunoglobulinas (Igs) presentes en el suero C7. El protocolo se describe a continuación:

**Sensibilización:** se sensibilizaron placas de poliestireno de fondo plano de 96 pozos (Greiner, Austria) con 100 µl del mAb CA5E6 1 µg/ml (100 ng/pozo) diluido en solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> 50 mM pH 9,6 (solución de sensibilización). Se incubó durante 1 h a 37 °C y luego toda la noche a 4 °C.

**Bloqueo:** el bloqueo de los sitios de interacción inespecífica se realizó con 200 µl/pozo de una solución de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma, EE. UU.) 1% (P/V) en PBS (solución de bloqueo). Se incubó durante 1 h a 37 °C.

**Primera incubación:** se agregaron 100 µl de diluciones sucesivas 1:2 del estándar de rhIFN-α2b de origen bacteriano desde 10 ng/ml hasta 0,078 ng/ml, y de las muestras a analizar. Para ello se empleó una solución de BSA 0,1% (P/V) en PBS con el agregado de Tween 20 al 0,05% (V/V) (solución diluyente). Las muestras se ensayaron realizando diluciones seriadas al medio de manera de poder compararlas con el estándar en el rango de linealidad de la curva. Se incubó durante 1 h a 37 °C.

Se realizó un control sin el agregado de rhIFN-α2b, para evaluar la posible unión inespecífica de los reactivos (control negativo). Para ello, durante esta etapa se reemplazó el IFN por 100 µl de solución diluyente.

**Segunda incubación:** se adicionaron 100 µl de suero de conejo C7 anti-rhIFN-α2b diluido 1:1000 con solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37 °C.

**Tercera incubación:** se agregaron 100 µl de anticuerpo de cabra anti-Igs de conejo conjugado con la enzima peroxidasa (Aglient, DAKO, EE.UU.) 0,25 g/l diluido 1:2000 en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37 °C.

**Reacción reveladora:** el revelado se realizó mediante reacción enzimática empleando como sustrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,015 volúmenes diluida en solución de citrato/fosfato de sodio 50 mM, pH 5,3 (solución de revelado), con el agregado del cromógeno o-fenilendiamina (OPD, Sigma, EE. UU.) en una concentración de 0,5 mg/ml. Se colocaron 100 µl por pozo de dicha solución y se incubó la placa en oscuridad y a temperatura ambiente durante 15-30 min. Una vez transcurrido el tiempo estipulado se observó la aparición de color debido a la reducción del sustrato, catalizada por la peroxidasa, con la oxidación simultánea del cromógeno. La reacción



se detuvo mediante el agregado de 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N y la lectura del color se efectuó a una  $\lambda=492$  nm en un lector de placas de microtitulación (Labsystems Multiskan MCC/340).

**Cuantificación:** se graficaron los valores de absorbancia en función de las concentraciones de rhIFN- $\alpha$ 2b empleado como estándar y de las diluciones de las muestras en escala logarítmica. La concentración de las muestras se determinó utilizando el ensayo de rectas paralelas [140].

### **7.2. Identificación de las variantes de GMOP-IFN $\alpha$ 2b en sobrenadantes de cultivo mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) seguido de western blot**

La identidad de las distintas variantes de GMOP-IFN en el sobrenadante de cultivo de las líneas CHO-K1 productoras de cada proteína fue analizada mediante PAGE con el agregado de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) en condiciones reductoras, seguida de un procedimiento de transferencia a membranas, o *western blot*, para llevar a cabo una reacción de inmunodetección específica de la molécula de IFN.

La electroforesis se desarrolló en base al método descrito por Laemmli [141], utilizando para el armado de los geles el sistema de electroforesis modular vertical *Mini-Protean 3* (Bio-Rad, EE. UU.). Todos los geles fueron realizados en condiciones desnaturalizantes, en presencia de un agente reductor de enlaces disulfuro ( $\beta$ -mercaptoetanol). Para ello, se utilizó un gel de apilamiento con una concentración de acrilamida/bisacrilamida de 5% (P/V) y un gel de separación con una concentración de acrilamida/bisacrilamida de 15% (P/V). Las muestras se prepararon con una solución de Tris-HCl 50 mM, SDS 2% (P/V), glicerol 10% (V/V),  $\beta$ -mercaptoetanol 5% (V/V), azul de bromofenol 0,05% (P/V), pH 6,8 (solución de siembra) en proporción muestra/solución de siembra de 3:1. Las muestras fueron incubadas a 100 °C durante 5 min para favorecer la desnaturalización de las proteínas, y sembradas directamente sobre el gel de apilamiento. La corrida electroforética se llevó a cabo empleando como solución de corrida: Tris 25 mM, glicina 0,2 M; SDS 0,1%, a un voltaje constante de 200 V, sumergiendo el módulo en baño de hielo. La corrida finalizó cuando el frente de corrida alcanzó 0,5 cm del borde inferior del gel de separación.

Seguidamente se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF (Bio-Rad, EE. UU.), empleando el mismo equipo de Bio-Rad (transferencia sumergida). Se utilizó un protocolo estándar de transferencia de proteínas, empleando como solución de transferencia Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8,3, metanol 20% (V/V), a intensidad de corriente constante de 180 mA durante 1 h, refrigerando el dispositivo en todo momento. A

continuación, se realizó el bloqueo de los sitios de la membrana sin proteínas adsorbidas, por inmersión de la misma en una solución de TBS-leche descremada 5% (P/V) y Tween 0,05% (V/V) durante toda la noche.

Para la detección inmunoquímica del IFN transferido a la membrana se utilizó el sistema SNAP i.d.<sup>®</sup> (Millipore, EE. UU.). Con este sistema las soluciones de anticuerpos y de lavado son forzados a pasar a través de la membrana mediante un sistema de vacío, permitiendo menores tiempos de incubación. Luego del bloqueo, se empleó una solución de pAb C7 diluida 1:800 en solución diluyente de *western blot* [TBS-leche descremada 0,5% (P/V) con el agregado de Tween 20 0,05% (V/V)]. Dicha solución se incubó en contacto con la superficie transferida de la membrana durante 10 min. Posteriormente, esta solución fue removida mediante aplicación de vacío, forzando su paso a través de la membrana. La segunda incubación se realizó de igual manera con anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo conjugados con la enzima peroxidasa (Aglient, DAKO, EE.UU.) en una dilución 1:1000 en solución diluyente de *western blot*. Se incubó durante 10 min y se removió por vacío. Por último, para el revelado se empleó el kit de quimioluminiscencia ECL<sup>™</sup> *Western Blotting Analysis System* (GE Healthcare, EE. UU.), siguiendo las indicaciones del fabricante. La membrana se incubó con el reactivo durante 1 min a temperatura ambiente, se escurrió y se colocó en un soporte de acrílico cubriéndola con un nylon para evitar el contacto del sustrato con la película reveladora. Finalmente, la membrana fue expuesta a una película fotográfica Kodak Biomax XAR Film (Kodak) en un cuarto oscuro durante 1,5-2 min. El revelado de la película fotográfica se efectuó en forma manual empleando el método convencional de revelado y fijación (Reforzador y Fijador GBX, Kodak).

Luego de cada etapa se realizaron tres lavados, los cuales consistieron en pasar 15 ml solución de TBS-Tween 20 0,05% (V/V) a través de la membrana mediante la aplicación de vacío.

## **8. PURIFICACIÓN DE LAS DIFERENTES VARIANTES DE GMOP-IFN MEDIANTE CROMATOGRFÍA DE INMUNOAFINIDAD**

La cromatografía de inmuoafinidad fue introducida en 1968 [142] y constituye una herramienta poderosa para el aislamiento de proteínas. Bajo las condiciones adecuadas, se pueden obtener factores de purificación entre 1000 y 5000 veces en un único paso. La cromatografía de inmuoafinidad puede dividirse en dos etapas:

- A) Preparación de una matriz conteniendo el anticuerpo inmovilizado.
- B) Unión del antígeno a la matriz de anticuerpo y elución del mismo.

### 8.1. Equipamiento

Para las purificaciones se emplearon los cromatógrafos líquidos ÄKTA Basic y ÄKTA purifier (GE Healthcare, EE. UU.) equipados con un sistema de bombas (P-900), un colector automático de fracciones (FRAC-900), una unidad de detección de absorbancia (UV-900) y otra de pH y conductividad (PH/C-900).

### 8.2. Preparación de la matriz de inmun afinidad CA5E6-Sepharose

Para la purificación de las variantes de GMOP-IFN se empleó el mAb CA5E6 como ligando de afinidad, el cual fue inmovilizado a la matriz de *Sepharose* (GE Healthcare, EE. UU.).

#### 8.2.1. Purificación del mAb CA5E6

La purificación del mAb CA5E6 se realizó a partir de un fluido ascítico murino disponible en el laboratorio, mediante cromatografía de afinidad a proteína A de acuerdo a la metodología descrita a continuación [143].

**Armado de la columna:** un volumen de 20 ml de gel de Proteína A MabSelect SuRe LX (GE Healthcare, EE. UU.) se empaquetó en una columna XK 16/20 (8 cm de altura de matriz x 1,6 cm de diámetro interno; GE Healthcare, EE. UU.).

**Equilibrado:** la matriz se equilibró con 5 volúmenes de columna (VC) de una solución de Tris-HCl 50 mM, NaCl 3 M, pH 9; verificándose que el pH a la salida de la columna fuese igual al de la solución de equilibrado.

**Acondicionamiento de la muestra:** 45 ml de líquido ascítico se ajustaron a una concentración de NaCl 3 M y a pH 9, mediante el agregado de 2,25 g de NaCl sólido y 8,3 ml de solución de Tris 50 mM, pH 9. Posteriormente, se centrifugó a 200 x *g* durante 5 min y el sobrenadante se filtró a través de una membrana de acetato de celulosa de 0,45 µm empleando jeringa.

**Siembra:** la muestra acondicionada se aplicó a la matriz teniendo en cuenta su capacidad y la concentración de Igs presentes en el fluido ascítico. El *flowthrough* (FT) se recolectó en un tubo cónico para su posterior análisis.

**Lavado 1:** las proteínas no retenidas por la matriz cromatográfica se eliminaron mediante el lavado de la misma con solución de Tris/HCl 50 mM, NaCl 3 M, pH 9, hasta demostrar la ausencia de proteínas por medición espectrofotométrica a  $\lambda=280$  nm. El lavado se recolectó en una única fracción.

**Elución:** las lgs retenidas fueron eluidas mediante descenso del pH del lecho cromatográfico. Para tal fin, se empleó una solución de ácido cítrico/NaOH 0,1 M, pH 3. Se recolectaron fracciones de 10 ml y se neutralizaron con 2,5 ml de solución de Tris 1 M, pH 9.

**Lavado 2:** para eliminar los restos de lgs y reactivos que pudieran quedar en la columna, la misma se lavó con 5 VC de solución fosfato de sodio 20 mM, pH 7.

**Lavado 3:** posteriormente, se lavó con 2,2 VC de solución de NaOH 0,1M, NaCl 1M para realizar una sanitización de la columna.

**Lavado 4:** con el objetivo de reacondicionar la matriz cromatográfica, se realizó un último lavado con 2,5 VC de solución de fosfato de sodio 20 mM, pH 7.

**Conservación:** con el propósito de conservar la resina para usos posteriores, se empleó una solución de etanol 20% (V/V) en solución de fosfato de sodio 20 mM, pH 7, conservándose a una temperatura entre 4-8 °C.

El flujo establecido durante las distintas etapas del proceso cromatográfico fue de 1 ml/min (0,5 cm/min).

Finalizado el proceso cromatográfico, se mezclaron las fracciones correspondientes al pico de elución, las cuales fueron monitoreadas por lectura de absorbancia a  $\lambda=280$  nm. El volumen total obtenido fue dializado contra solución de NaCl 0,5 M en NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M, pH 8,3, con el objeto de acondicionar los anticuerpos para su acoplamiento a una matriz de *Sepharose* activada con bromuro de cianógeno (CNBr).

### 8.2.2. Determinación de la concentración y pureza del mAb purificado

La concentración del mAb purificado se determinó por medición espectrofotométrica a  $\lambda = 280$  nm, empleando como blanco de lectura la solución de diálisis. Para realizar la cuantificación se utilizaron las lecturas de absorbancia de la muestra y del blanco, a través de la siguiente ecuación:

$$C_{mAb} \left( \frac{mg}{ml} \right) = 0,8 * (A_{muestra} - A_{blanco}) \quad (5)$$

La pureza del anticuerpo se evaluó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) con posterior coloración con azul brillante de Coomassie.

La electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) se desarrolló siguiendo esencialmente el método descrito por Laemmli [141], utilizando para el armado del gel el sistema de electroforesis modular vertical Mini-Protean 3 (Bio-Rad, EE. UU.). Con el agregado del detergente iónico dodecil sulfato de sodio (SDS) en presencia de un agente reductor de

enlaces disulfuro ( $\beta$ -mercaptoetanol) se generaron las condiciones desnaturalizantes necesarias.

Se utilizó un gel de apilamiento con una concentración de acrilamida/bisacrilamida del 5% (P/V) y un gel de separación con una concentración de acrilamida/bisacrilamida del 15% (P/V). Las muestras se prepararon con una solución de Tris-HCl 50 mM, SDS 2% (P/V), glicerol 10% (V/V),  $\beta$ -mercaptoetanol 5% (V/V), azul de bromofenol 0,05% (P/V), pH 6,8 (solución de siembra) en proporción 3:1. Las muestras fueron hervidas durante 5 min para favorecer la desnaturalización de las moléculas, y sembradas directamente sobre el gel de apilamiento. La corrida electroforética se llevó a cabo empleando una solución de corrida (Tris 25 mM, glicina 0,2 M; SDS 0,1%), a un voltaje constante de 200 V, sumergiendo el módulo en un baño de hielo. La corrida finalizó cuando el frente de corrida alcanzó una distancia de 0,5 cm con respecto al borde inferior del gel de separación.

Luego de la corrida electroforética, para realizar la coloración con azul brillante de Coomassie, el gel se sumergió durante 15 min en solución de coloración [azul brillante Coomassie R-2500 1% (P/V), metanol 40% (V/V) y ácido acético 10% (V/V)]. Posteriormente, se decoloró con solución decolorante [metanol 7,5% (V/V) y ácido acético 5% (V/V)] hasta la aparición de bandas nítidas y disminución de la tinción de fondo. Las incubaciones con el colorante y con los diferentes lavados se realizaron en agitación.

### **8.2.3. Acoplamiento del mAb a la matriz de sepharose**

El mAb purificado se acopló a la matriz de *Sepharose*<sup>TM</sup> 4B activada con CNBr, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante, empleando la solución de acoplamiento NaCl 0,5 M; NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M; pH 8,3. Se prepararon 12 ml de resina.

El porcentaje de mAb acoplado a la resina se calculó a partir de la medida de la concentración de Igs en la solución previa y posterior a la reacción de acoplamiento.

La capacidad teórica de la matriz para unir las variantes de GMOP-IFN se calculó teniendo en cuenta la masa de anticuerpo unido y considerando que cada molécula de Ig (~150 kDa) unida al soporte ligará por lo menos una molécula de GMOP-IFN (~19 kDa). La capacidad teórica de la matriz se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Capacidad Teórica (mgIFN)} = \frac{\text{masa}_{\text{mAb}}(\text{mg}) * 19.000 \text{ mg/mmol}}{150.000 \text{ mg/mmol}} \quad (6)$$

Donde  $\text{masa}_{\text{mAb}}$  es la masa de anticuerpo inmovilizado en la matriz (expresada en mg), calculada a partir de la eficiencia del acoplamiento.

### **8.3. Cromatografía de inmunoafinidad empleando la resina CA5E6-Sepharose**

La purificación de las variantes de GMOP-IFN, obtenidas a partir del cultivo de las líneas celulares CHO-K1 recombinantes, se realizó empleando la matriz de afinidad CNBr-Sepharose-mAbCA5E6 empaquetada en una columna XK 16/20. Para la purificación de cada una de las versiones de la citoquina se emplearon 3 ml de resina sin uso previo.

Antes de comenzar el protocolo de purificación, se realizó el acondicionamiento de las muestras con el fin de lograr la interacción apropiada entre la citoquina y el mAb CA5E6. El procedimiento consistió en el agregado de Tritón X-100 al sobrenadante de cultivo hasta alcanzar una concentración final de 0,3% (V/V) y el posterior ajuste del pH a 7,5 mediante el agregado de HCl o NaOH diluido, según fuese necesario. Finalmente, la muestra se filtró utilizando un sistema de filtración por vacío, que emplea membranas de acetato de celulosa de 0,45  $\mu\text{m}$  (Sartorius Stedim, Francia) y portafiltros de 500 y 1000 ml de capacidad (Nalgene, EE.UU.).

El protocolo desarrollado para la purificación mediante cromatografía de inmunoafinidad se describe a continuación:

**Equilibrado:** la matriz se equilibró con 5 VC de solución de equilibrado (Tris 25 mM; Tritón X-100 0,3% (V/V); pH 7,5) a un flujo de 1 ml/min (0,5 cm/min).

**Siembra:** se sembró el volumen adecuado de muestra acondicionada, en función de la capacidad de la resina y la concentración de citoquina en la siembra, estimada por ELISA sándwich (sección 7.1), a un flujo lineal aproximado de 1 cm/min (flujo volumétrico de 2 ml/min).

**Lavado 1:** la matriz se lavó con 5 VC de una solución de Tris 25 mM, pH 7,5; NaCl 0,5 M; Tritón X-100 0,2% (V/V).

**Lavado 2:** la matriz se lavó con 12 VC de una solución de NaCl 0,15 M.

Cada lavado se recogió en fracciones para su posterior análisis. El flujo aplicado durante las etapas de los lavados fue igual al empleado durante la fase de equilibrado.

**Elución:** las distintas proteínas de GMOP-IFN retenidas fueron eluidas por descenso de pH. Para tal fin, se emplearon 11 VC de una solución de glicina 100 mM, pH 2; trabajando al mismo flujo utilizado durante la etapa de equilibrado. El eluato fue recolectado en fracciones, que fueron neutralizadas con solución de Tris 1 M, pH 8.

Todas las fracciones se conservaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis.

**Conservación de la matriz:** la matriz se lavó con 15 VC de solución de conservación (Tris/HCl 20 mM; azida sódica 0,02% (P/V); pH 7) y se guardó a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su reutilización.

#### 8.4. Concentración y diafiltración de las variantes de GMOP-IFN

El proceso de purificación de cada una de las variantes de GMOP-IFN- $\alpha$ 2b por cromatografía de inmunoafinidad se realizó reiteradas veces, hasta obtener cantidad suficiente de la proteína purificada para la posterior determinación de sus características analíticas y funcionales, parámetros farmacocinéticas e inmunogenicidad. Para cada proteína, las fracciones correspondientes al pico de elución de las distintas cromatografías se mezclaron y se diafiltraron contra PBS. Para ello, se emplearon columnas de filtración para centrífuga Amicon® Ultra-15 (Millipore, EE. UU.), provistas con membranas de ultrafiltración de 10 kDa. El protocolo desarrollado se describe a continuación:

**Hidratación:** con el objetivo de hidratar la membrana, se agregaron 12 ml de agua ultra pura a la columna de diafiltración, centrifugando luego a 5000 rpm durante 7 min.

**Concentración:** en el dispositivo previamente hidratado se agregaron 12 ml de la solución de proteína, centrifugando luego a 4000 rpm durante 15 min. Esto redujo el volumen de solución a aproximadamente 1 ml.

**Diafiltración:** sobre la solución previamente concentrada se agregaron 10 ml de PBS, centrifugando luego a 4000 rpm durante 15 min. Este procedimiento se repitió dos veces más. La última centrifugación se realizó durante 25 min, a fin de obtener la proteína en un volumen final de 600  $\mu$ l, aproximadamente.

**Regeneración de la membrana:** con el objetivo de acondicionar la membrana para posteriores usos, se agregaron 12 ml de NaOH 0,1 N y se centrifugó a 5000 rpm durante 7 min. Luego se realizó un lavado agregando 12 ml de agua y centrifugando a 5000 rpm durante 7 min. Finalmente se agregaron 12 ml de etanol 20% V/V y se centrifugó durante 5 min. El volumen de etanol remanente en la columna funciona como conservante de la membrana, por lo que no se descartó.

#### 8.5. Evaluación de la concentración y pureza de las variantes de GMOP-IFN

La cuantificación de las variantes de GMOP-IFN purificadas se llevó a cabo por medición espectrofotométrica a  $\lambda = 280$  nm, empleando como blanco de lectura la solución de elución neutralizada con solución de Tris 1 M, pH 8. De esta manera, conociendo su coeficiente de extinción, el cálculo de la concentración se realizó utilizando la siguiente ecuación:

$$C \left( \frac{mg}{ml} \right) = \frac{(A_{muestra} - A_{blanco})}{0,94 \left( \frac{mg}{ml \cdot cm} \right) \times L (cm)} \quad (7)$$

Donde C es la concentración de GMOP-IFN o sus variantes; A, la absorbancia a  $\lambda = 280$  nm; 0,924, la absortividad específica del rhIFN- $\alpha$ 2b no glicosilado a  $\lambda = 280$  nm, y L, la longitud del camino óptico (1 cm).

Se empleó un espectrofotómetro UV-visible (Ultrospec 2000, GE Healthcare, EE. UU.) y cubetas de cristal de cuarzo.

La pureza de la proteína se evaluó mediante SDS-PAGE con posterior coloración con azul brillante de Coomasie, siguiendo el protocolo descrito anteriormente (sección 7.2).

## **9. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL Y ANALÍTICA DE LAS VARIANTES DE-INMUNIZADAS DE GMOP-IFN**

### **9.1. Valoración de la actividad biológica in vitro de las variantes de GMOP-IFN**

El empleo de bioensayos precisos y bien caracterizados para productos biológicos es fundamental para su desarrollo como productos terapéuticos. Si bien existe un alto número de análisis fisicoquímicos que proveen diversa información de interés, sólo los bioensayos pueden cuantificar la actividad biológica (AB) inducida por una determinada proteína en células o tejidos.

Los ensayos más utilizados para la medición de la potencia biológica de los IFNs se basan en su actividad antiviral. No obstante, el descubrimiento de otras actividades biológicas de esta citoquina ha promovido el desarrollo de bioensayos que se basan en la inhibición de la proliferación celular, en la regulación de funciones celulares y en funciones inmunomoduladoras [144].

#### **9.1.1. Actividad biológica antiviral**

Los ensayos de valoración biológica antiviral (ABAV) de los IFNs cuantifican la actividad inhibitoria que ejercen estas citoquinas sobre la propagación o replicación viral [145]. El procedimiento más simple y conveniente consiste en medir la capacidad del IFN para proteger a las células susceptibles del efecto citopático de un virus lítico para un rango de concentraciones de la citoquina. Existe una gran variedad de sistemas línea celular/virus; en particular, en el presente trabajo se ensayó el sistema: línea celular MDBK/virus VSV.

Para realizar el ensayo, previamente puesto a punto en nuestro laboratorio [42], se utilizó el estándar internacional de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de hIFN- $\alpha$ 2b



producido en *E. coli* obtenido del *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC 95/566) y se siguió la metodología que se detalla a continuación.

La línea celular MDBK fue cultivada en medio de crecimiento [MEM suplementado con SFB 10% (V/V)]. Cuando el cultivo se encontraba en fase de crecimiento exponencial, las células se cosecharon, se contaron y se resuspendieron de manera de obtener una densidad celular de  $2,5 \cdot 10^5$  cél/ml para establecer un cultivo en monocapa. Se sembraron 100  $\mu$ l de esta suspensión celular en una placa de cultivo estéril de 96 pozos y se incubó durante 24 h a 37 °C. Se eliminó el sobrenadante de cultivo por inversión, se escurrió y se colocaron 100  $\mu$ l por pozo de diluciones sucesivas 1:2 en medio de ensayo (medio MEM suplementado con SFB 2% (V/V)) de las variantes de GMOP-IFN junto al estándar de hIFN- $\alpha$ 2b, desde una actividad volumétrica de 20 UI/ml hasta 0,156 UI/ml. Luego, la placa se incubó durante 6 h a 37 °C.

Se eliminó el sobrenadante por inversión, se escurrió y se colocaron 100  $\mu$ l de una dilución apropiada del virus (VSV) en medio de ensayo, incubándose durante 20 h hasta observar el máximo efecto citolítico en aquellos pozos correspondientes a las células no tratadas con IFN.

Para revelar el ensayo, se eliminó el sobrenadante de cultivo por inversión, se escurrió y se adicionaron 50  $\mu$ l por pozo de una solución de cristal violeta (Anedra, Argentina) 1% (P/V) preparada en metanol (Merck, Alemania) 40% (V/V). Se incubó durante 15 min a 37 °C. Esta etapa tiene por objetivo fijar y colorear aquellas células que no fueron lisadas por el virus y, por lo tanto, permanecieron adheridas al sustrato. Posteriormente, se eliminó el colorante y se realizaron lavados con agua destilada hasta verificar ausencia del colorante en los lavados. Para disolver el colorante fijado, se agregaron 200  $\mu$ l de ácido acético (Merck, Alemania) 20% (V/V). La lectura del color generado se efectuó a una  $\lambda=540$  nm en un lector de placas de microtitulación que permite una homogenización de la placa previo a la lectura.

Se graficaron los datos de absorbancia en función de los valores correspondientes de actividad del rhIFN- $\alpha$ 2b (estándar) y de las diluciones de las muestras en escala logarítmica. Se calcularon los valores de actividad biológica para cada una de las nuevas moléculas mediante comparación con el estándar utilizando el método de comparación de rectas paralelas.

Finalmente, se determinó la actividad biológica específica (ABE) realizando el cociente entre la ABAV y la concentración de las variantes de GMOP-IFN en las muestras correspondientes, obtenida esta última por ELISA sándwich (sección 7.1) para las muestras de sobrenadante de cultivo, o por medición de absorbancia a  $\lambda=280$  nm para las muestras purificadas.

En cada ensayo, el estándar de hIFN- $\alpha$ 2b y las muestras se procesaron por triplicado, realizándose, además, dos tipos de controles:

- » Control de crecimiento, en ausencia de IFN y de virus, para evaluar la máxima proliferación celular cuando no se produce infección viral. Para ello, se reemplazaron los 100 µl de la dilución del IFN estándar o de las muestras y los 100 µl de la dilución del virus por 200 µl de medio de ensayo.
- » Control de lisis, en ausencia de IFN, para evaluar el efecto del virus sobre las células. Para ello, se adicionaron 100 µl de medio de ensayo en lugar de la dilución del IFN.

### **9.1.2. Actividad biológica antiproliferativa**

El ensayo de valoración de la actividad antiproliferativa (ABAP) *in vitro* del hIFN- $\alpha$ 2b se basa en la cuantificación de los efectos que esta citoquina induce sobre la viabilidad y proliferación de la línea celular Daudi [146]. Con este fin, se empleó el kit *Cell Titer 96™ AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (Promega, EE. UU.), el cual se compone de dos reactivos: MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxi-fenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium]] en una concentración de 2 mg/ml y PMS [metasulfato de fenazina] en una concentración de 0,92 mg/ml.

Las condiciones del bioensayo se optimizaron previamente en el laboratorio, utilizando el estándar internacional de la OMS: rhIFN- $\alpha$ 2b producido en *E. coli* (NIBSC 95/566). El protocolo empleado se detalla a continuación.

En placas estériles de fondo plano de 96 pozos se colocaron 50 µl por cavidad de diluciones sucesivas 1:2 de las muestras junto al estándar de hIFN- $\alpha$ 2b en medio RPMI suplementado con 10% SFB (V/V) (medio de crecimiento), desde una concentración de actividad de 50 UI/ml hasta 0,39 UI/ml. Las muestras se ensayaron en iguales condiciones, realizando una dilución inicial adecuada que permitió compararlas con el estándar en el rango de linealidad de la curva dosis-respuesta.

La línea celular Daudi fue cultivada en medio de crecimiento. Para el ensayo se preparó una suspensión de  $1 \cdot 10^5$  cél/ml, de la cual se adicionaron 50 µl en cada pocillo. Luego la placa se incubó durante 96 h en estufa gaseada a 37 °C.

Para revelar el ensayo, se agregaron 20 µl por pocillo del reactivo de color, preparado en el momento mezclando 2 ml de solución de MTS con 100 µl de solución de PMS por cada placa. Se incubó durante 5 h a 37 °C. Mediante este método colorimétrico se mide la proliferación celular, poniendo en evidencia la presencia de enzimas deshidrogenasas que se encuentran en las células metabólicamente activas y cuya actividad se relaciona en forma directa con la cantidad de células viables presentes en el cultivo. Las enzimas deshidrogenasas

catalizan la biorreducción del MTS en un cromógeno soluble (azul de formazán) que absorbe a una longitud de onda de 490 nm. El PMS actúa como dador de electrones en la reacción de óxido-reducción. La cantidad de producto generado es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas en el cultivo. La absorbancia del cromógeno se midió a una  $\lambda = 492$  nm contra lectura de fondo de placa a  $\lambda = 690$  nm. Las mediciones efectuadas a longitudes de onda entre 630-700 nm ayudan a eliminar el ruido de fondo dado por restos celulares y por la presencia de componentes capaces de generar absorbancia no específica.

Se graficaron los datos de absorbancia en función de las concentraciones correspondientes de actividad del rhIFN- $\alpha$ 2b (estándar) y de las diluciones de las muestras en escala logarítmica. Se calcularon los valores de actividad biológica para cada una de las nuevas moléculas mediante comparación con el estándar, utilizando el método de comparación de rectas paralelas.

Finalmente, el valor de ABE se determinó realizando el cociente entre la ABAP y la concentración de las moléculas en las muestras.

### **9.2. Predicción de la probabilidad de O-glicosilación**

Todas las construcciones fueron analizadas empleando el servidor bioinformático *ISOGlyP* (<http://isoglyp.utep.edu>) [147] con el fin de predecir la probabilidad de O-glicosilación de Ser/Thr y el número aproximado de sitios susceptibles de incorporación de O-glicanos en cada variante, los cuales derivan tanto de la incorporación del péptido GMOP a la molécula de hIFN- $\alpha$ 2b como de la secuencia de la citoquina nativa. Este predictor permite evaluar un potencial sitio de O-glicosilación en términos de la especificidad de isoformas de las distintas N-acetilgalactosamina transferasas (GalNAc-Ts) y permite diferenciar cuantitativamente la preferencia de los dominios catalíticos de las GalNAc-Ts hacia los diferentes residuos aminoacídicos, por medio de la asignación de un valor numérico denominado EVP (del inglés *enhancement value product*). Residuos con valores EVP superiores a 1,0 tienen elevada probabilidad de ser glicosilados por una dada transferasa, mientras valores EVP inferiores a 1,0 sugieren que la glicosilación de ese sitio no sería favorable [148].

### **9.3. Análisis del perfil de glicoformas de las variantes de-inmunizadas de GMOP-IFN por medio de isoelectroenfoque**

Si bien cada proteína presenta una secuencia primaria única, dentro de cada muestra se puede encontrar una “población” de proteínas que difieren en el patrón de glicosilación

(glicofomas o isoformas). La diferencia principal entre las bandas observadas está dada por el contenido de ácido siálico que le confiere a cada molécula una carga eléctrica particular.

La técnica de isoelectroenfoque (IEF) se basa en la separación de las isoformas de las moléculas de acuerdo a su carga eléctrica, durante su desplazamiento a través de un gradiente de pH, como consecuencia de la aplicación de una diferencia de potencial. De esta manera, mediante focalización isoeléctrica se analizaron las isoformas presentes en las proteínas con comprobada actividad biológica antiviral: GMOP-IFN-VAR2 y GMOP-IFN-VAR3, junto a la citoquina original GMOP-IFN y al IFN-WT, utilizando un sistema de GE Healthcare compuesto por una cuba de electroforesis (Multiphor II), un baño refrigerante (Multitemp III) y una fuente de voltaje (EPS3500XL).

Se emplearon geles de 0,5 mm de espesor, con una concentración de acrilamida/bisacrilamida del 8% (P/V) con el agregado de urea 7 M. Para obtener el rango de pH deseado se empleó una mezcla de anfolitos con un rango de pI 3,5-5,5 (Pharmalyte, GE Healthcare, EE. UU.). Una vez preparado el soporte electroforético, se realizó el pre-enfocado de los anfolitos durante 1h a 10 W, 2000 V y 100 mA con el fin de generar el gradiente de pH. Posteriormente se sembraron 10 µl de cada muestra a una distancia de 1 cm desde el cátodo. El enfocado se realizó durante 40 min, empleando las mismas condiciones que para la etapa de pre-enfocado. La detección se realizó mediante tinción con el colorante *Coomasie blue* coloidal.

## **10. EVALUACIÓN FARMACOCINÉTICA DE LAS VARIANTES FUNCIONALES DE GMOP-IFN**

Con el objetivo de evaluar el efecto de las modificaciones incorporadas en las variantes de GMOP-IFN sobre los parámetros farmacocinéticos, se realizaron experimentos *in vivo* empleando animales de experimentación. Se estudió la farmacocinética de las proteínas GMOP-IFN-VAR2 y GMOP-IFN-VAR3, comparándolas con la correspondiente molécula de GMOP-IFN no modificada.

### **10.1. Metodología experimental**

Se emplearon ratas Wistar hembras de dos meses de edad, con un peso promedio de 200 g (Centro de Experimentaciones Biológicas y Bioterio, FCV-UNL), las cuales fueron mantenidas en un bioterio a una temperatura controlada de 24 °C y un fotoperíodo luz/oscuridad de 12 h, proporcionándoles agua y comida sin restricciones. Las ratas fueron

separadas en lotes de ocho animales cada uno e inyectadas por vía subcutánea con una dosis de 5 µg de proteína/animal de la correspondiente proteína. Se recolectaron muestras de sangre a diferentes tiempos post-inyección, de manera de obtener un n=4 para cada tiempo. Para ello, los lotes de animales se dividieron en dos grupos de cuatro ratas cada uno, realizándose extracciones de sangre alternadas por cada grupo: grupo 1 (t= 5 min, 1 h, 4 h, 18 h, 48 h) y grupo 2 (t= 30 min, 2 h, 6 h, 8 h, 10 h, 24 h). Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente y el plasma fue separado y conservado a -20 °C para su posterior análisis.

La cuantificación de las proteínas de interés en el plasma se realizó mediante valoración de su ABAV *in vitro* (sección 9.1.1). Con los datos obtenidos se graficó la ABAV de cada muestra en función del tiempo transcurrido desde la inoculación de la molécula.

### 10.2. Estimación de parámetros farmacocinéticos

La complejidad del modelo farmacocinético que se elige para describir el comportamiento de una droga varía con la vía de administración, la duración de la distribución en tejidos y otros líquidos corporales y el proceso de eliminación.

La curva obtenida se analizó aplicando un modelo de un compartimento con absorción y eliminación de primer orden, el cual se ajusta de manera adecuada al comportamiento de drogas administradas en solución acuosa para todas las rutas extravasculares [149]. Este modelo asume que, si la distribución de un fármaco es instantánea, tanto la velocidad global de absorción como la velocidad de eliminación, se pueden describir como procesos de primer orden.

En el caso de una droga administrada en forma oral, la velocidad de desaparición de la droga en el tracto gastrointestinal (GI) se describe como:

$$\frac{dG_I}{dt} = -FD_{GI}k_a \quad (8)$$

donde  $D_{GI}$  es la cantidad de droga en solución en el tracto gastrointestinal a cualquier tiempo  $t$ ,  $k_a$  es la constante de velocidad de absorción de primer orden y  $F$  es la fracción de fármaco absorbida. Integrando la ecuación 8 se obtiene:

$$D_{GI} = D_0 e^{-tk_a} \quad (9)$$

donde  $D_0$  es la dosis de la droga. Si la distribución es instantánea, el comportamiento de la droga una vez absorbida se puede ajustar a un modelo cinético de un compartimento, por lo

que la velocidad de eliminación de la droga del organismo se puede expresar como  $-k_e D_B$ , donde  $D_B$  es la cantidad de droga en el cuerpo en el tiempo  $t$  y  $k_e$  es la constante de eliminación de primer orden. La proporción de cambio de la cantidad de droga en el organismo es la diferencia entre la velocidad de captación (absorción) y la de salida (eliminación), por lo que:

$$dD_B = F k_a D_{GI} - k_e D_B \quad (10)$$

Reemplazando  $D_{GI}$  por la ecuación 9, integrando y reordenando se obtiene la ecuación general que describe la variación de la concentración de una droga en plasma ( $C_p$ ) a cualquier tiempo  $t$  luego de su administración extravascular:

$$C_p = \frac{F k_a D_0}{V_D (k_e - k_a)} (e^{-k_e t} - e^{-k_a t}) \quad (11)$$

donde  $V_D$  hace referencia al volumen de distribución de la droga. Simplificando esta ecuación se obtiene:

$$C_p = A e^{-k_e t} - A e^{-k_a t} \quad (12)$$

En la Figura 10 se muestra un perfil farmacocinético típico de una única administración de una droga por vía oral. La máxima concentración plasmática luego de la administración se denomina  $C_{m\acute{a}x}$  y el tiempo necesario para alcanzar dicha concentración  $T_{m\acute{a}x}$ , el cual es independiente de la dosis y depende de las constantes de absorción ( $k_a$ ) y de eliminación ( $k_e$ ).

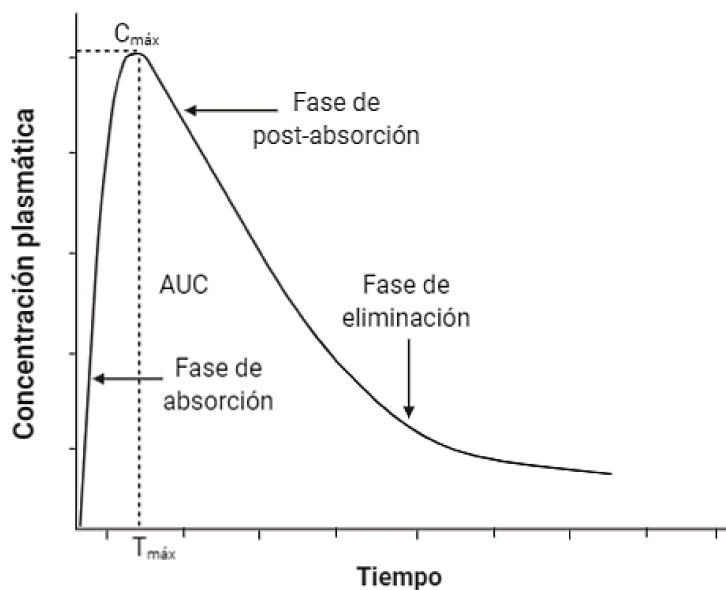


Figura10. Perfil plasmático de una droga inyectada por vía extravascular.

En el tiempo en el que la droga alcanza la  $C_{m\acute{a}x}$ , la velocidad de absorción iguala a la velocidad de eliminación, por lo que el cambio de la concentración de la droga en plasma es igual a cero:

$$\frac{dC_p}{dt} = \frac{F k_a D_0}{V_D (k_a - k_e)} (k_e e^{-k_e t} - k_a e^{-k_a t}) = 0 \quad (13)$$

lo cual puede ser simplificado a:

$$k_e e^{-k_e t} = k_a e^{-k_a t} \quad (14)$$

Aplicando logaritmos, se obtiene una ecuación para la determinación de  $T_{m\acute{a}x}$  (valor que luego se utiliza para el cálculo de  $C_{m\acute{a}x}$  mediante la ecuación 12):

$$T_{m\acute{a}x} = \frac{2,3 \log(k_a/k_e)}{k_a - k_e} \quad (15)$$

Los valores de  $A$ ,  $k_a$  y  $k_e$  se determinaron empleando el método de los residuales (sección 10.3).

Estos datos se utilizaron posteriormente para el cálculo del tiempo de vida media terminal ( $t_{1/2elim}$ ), de acuerdo con la siguiente expresión:

$$t_{1/2elim} = \frac{0,693}{k_e} \quad (16)$$

Este parámetro hace referencia al tiempo que debe transcurrir hasta que la concentración plasmática de la droga se reduzca a la mitad.

Un parámetro importante para caracterizar el comportamiento de una droga en un sistema dado es su velocidad de eliminación del organismo o *clearance* aparente ( $Cl_{app}$ ). El  $Cl_{app}$  es una medida de la depuración del fármaco que no tiene en cuenta la biodisponibilidad de la droga en el organismo. Se define como el volumen de plasma que es depurado de la droga por unidad de tiempo. El  $Cl_{app}$  se calculó como la dosis inyectada por vía subcutánea,  $D_0$ , dividida por el área bajo la curva de concentración de la droga en plasma en función del tiempo, AUC.

$$Cl_{app} = \frac{D_0}{[AUC]_t} \quad (17)$$

Los perfiles plasmáticos obtenidos para cada animal fueron analizados individualmente. Los parámetros farmacocinéticos  $T_{m\acute{a}x}$ ,  $C_{m\acute{a}x}$ ,  $t_{1/2elim}$  y  $Cl_{app}$  se expresaron como el valor promedio  $\pm$  SD de los datos obtenidos para cada animal ( $n = 4$ ). Los

parámetros farmacocinéticos de las diferentes moléculas fueron comparados utilizando el análisis de la varianza (ANOVA) y posterior test de comparación múltiple de Tukey, considerando la existencia de diferencias significativas cuando  $p \leq 0,05$ .

### **10.3. Estimación de parámetros farmacocinéticos mediante el método de los residuales**

El método de los residuales [150], es un procedimiento utilizado habitualmente en farmacocinética para ajustar datos experimentales a una curva. Permite separar una curva en sus componentes, a fin de calcular las constantes que caracterizan dicha función para determinar, finalmente, los parámetros farmacocinéticos de interés.

Siguiendo este método, el perfil plasmático de una droga administrada por una vía extravascular que es absorbida desde el sitio de inyección, distribuida en forma instantánea y posteriormente eliminada mediante una cinética de primer orden se describe de acuerdo con la ecuación (12). Si la constante de absorción  $k_a$  es mucho mayor que la constante de eliminación  $k_e$ , a tiempos tardíos la absorción de la droga será completa, por lo cual el segundo término de la ecuación (12) se acercará a un valor nulo. En este momento, la concentración plasmática se describirá según la siguiente expresión:

$$C_p^t = Ae^{-k_e t} \quad (18)$$

donde  $C_p^t$  representa la concentración plasmática a un tiempo tardío desde el momento de inyección. Aplicando logaritmos se obtiene la recta descrita por la ecuación (19), la cual permite el cálculo de la constante de eliminación  $k_e$ , a partir de la pendiente, y de la constante  $A$ , a partir de la ordenada al origen.

$$\log C_p^t = \frac{-k_e}{2,3} + \log A \quad (19)$$

La constante de absorción  $k_a$  puede ser calculada a partir de la pendiente de la recta que resulta de la representación gráfica del logaritmo de la concentración plasmática residual en función del tiempo, como se describe en la ecuación (20).

$$\log(C_p^t - C_p) = \frac{-k_a t}{2,3} + \log A \quad (20)$$



## **11. EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD EX VIVO DE GMOP-IFN Y SUS VARIANTES DE-INMUNIZADAS**

Con el fin de evaluar el efecto de las mutaciones introducidas sobre la inmunogenicidad de GMOP-IFN, se llevó a cabo un análisis experimental *ex vivo*. Dicho estudio consistió en determinar la activación de linfocitos T en muestras de células mononucleares de sangre periférica de donantes sanos, expuestas a la proteína original o sus variantes de-inmunizadas. El protocolo desarrollado se describe a continuación.

### **11.1. Purificación de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humana**

Para llevar a cabo la extracción de muestras de sangre humana, el plan de trabajo del presente proyecto fue evaluado por el Comité Asesor de Ética y Seguridad de la Investigación de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la UNL, quien otorgó el aval institucional para el desarrollo del mismo en su sesión del día 4 de abril de 2013 que obra en Acta 02/13 de la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la UNL. En el mismo se ha manifestado el compromiso de asumir las recomendaciones y guías sugeridas por el mencionado Comité de Ética para la obtención de muestras de sangre a partir de donantes voluntarios y la manipulación de las mismas.

La purificación de CMSP se realizó a partir de muestras de sangre extraídas de 26 donantes sanos, voluntarios, que se encontraban en condiciones de ayuno y fueron tratadas con citrato de sodio como agente anti-coagulante. Para ello se aplicó el método que emplea Ficoll-Hypaque [151] ya que resulta muy conveniente desde el punto de vista de la pureza alcanzada y del costo por muestra.

De la muestra de sangre entera de cada donante se tomó una pequeña alícuota que fue conservada a -80 °C, con el fin de realizar la posterior tipificación de los haplotipos de las moléculas HLA-DRB1 correspondientes.

Para obtener las CMSP, una vez extraída la muestra de sangre anticoagulada se trasvasó a tubos cónicos de 50 ml y se centrifugó a temperatura ambiente durante 20 min a 200 x *g*, sin freno. Luego, se lavó 2 veces con solución fisiológica (relación 1:1) y se volvió a centrifugar de la misma manera. La interfase entre el plasma rico en plaquetas (PRP) y los eritrocitos y granulocitos fue colectada en tubos cónicos de 50 ml y llevada a un volumen final de 35 ml con solución fisiológica. Esta muestra (enriquecida en células mononucleares) fue sembrada sobre 15 ml de Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Suecia) frío y centrifugada durante 35 min a 400 x *g*. La capa de células mononucleares se colectó en tubos cónicos de 15 ml y se

lavó 2 veces con solución fisiológica. Finalmente, las CMSP se resuspendieron en solución fisiológica para proceder a su recuento y posterior almacenamiento a  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , siguiendo la metodología de criopreservación de líneas celulares animales (sección 6.3). Los criotubos, conteniendo las suspensiones celulares ( $1,5 \cdot 10^7$  -  $3 \cdot 10^7$  CMSP/ml) fueron almacenados en termos de  $\text{N}_2$  líquido.

### **11.2. Tipificación de los alelos HLA-DRB1 de las muestras de sangre**

Las alícuotas de sangre conservadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  fueron enviadas al Instituto PRICAI-Fundación Favalaro para realizar la tipificación del haplotipo de las moléculas CMH-II HLA-DRB1 correspondiente. Se centró el análisis en los alelos HLA-DRB1, ya que se ha demostrado previamente que éstos se encuentran principalmente relacionados con la presentación antigénica de péptidos derivados de proteínas terapéuticas [77]. Los estudios de tipificación se realizaron por medio de ensayos de secuenciación, empleando la tecnología Luminex.

La información obtenida a partir de este análisis fue comparada con las frecuencias de haplotipos HLA-DRB1 de la población mundial, obtenidas por medio de una búsqueda en una base de datos especializada: [www.allelefrequencies.net](http://www.allelefrequencies.net).

### **11.3. Descongelamiento de las CMSP criopreservadas**

Para revitalizar las células mononucleares para su utilización en los ensayos de inmunogenicidad se procedió al descongelamiento rápido de la suspensión celular, esencial para su óptima recuperación, según el procedimiento descrito en la sección 6.4.

Luego del lavado con medio basal, el sedimento de CMSP se resuspendió en el volumen necesario de medio de cultivo para obtener una suspensión celular de aproximadamente  $5 \cdot 10^6$  cél/ml.

### **11.4. Ensayo de activación in vitro de linfocitos T**

Para realizar los ensayos de linfo-activación es necesario contar con un sistema de presentación antigénica adecuado, que permita lograr la activación de los linfocitos T presentes en las muestras de células mononucleares. En este sentido, las células dendríticas son las candidatas por excelencia; sin embargo, su abundancia relativa en sangre periférica es muy baja, y son particularmente lábiles al proceso de descongelamiento. Por tal motivo, es necesario obtenerlas en una etapa previa al desafío antigénico.

Una manera de obtener células dendríticas es a partir del cultivo de monocitos, que luego son diferenciados mediante su incubación con citoquinas específicas que incluyen el

factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, del inglés *granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) y la interleuquina 4 (IL-4). Posteriormente, estas células son cultivadas en presencia del antígeno (en este caso GMOP-IFN-NG o sus variantes de inmunizadas: GMOP-IFN-VAR2 y GMOP-IFN-VAR3) de manera tal de promover su endocitosis y procesamiento en pequeños péptidos y la presentación de éstos en la membrana de la célula dendrítica. Luego se induce la maduración de estas células, a fin de que expresen las moléculas co-estimuladoras necesarias para la activación de los linfocitos T. Si estos linfocitos reconocen péptidos presentados en la superficie de las células dendríticas, en el contexto del CMH-II, tendrá lugar su activación, proliferación y diferenciación, secretando diferentes citoquinas, según el perfil de respuesta desarrollado [71].

A continuación, se describe con mayor detalle la metodología empleada en el presente trabajo de tesis.

#### **11.4.1. Obtención de monocitos a partir de CMSP**

Un método sencillo y efectivo que permite la obtención de monocitos a partir de CMSP consiste en cultivar estas células en placas de múltiples pozos, durante un período determinado y luego remover la suspensión celular. Durante este tiempo los monocitos se adhieren al fondo de la placa y el resto de las poblaciones celulares presentes en la muestra permanecen en suspensión [152]. Dicho fenómeno de adhesión diferencial de los monocitos se debe a que la fibronectina expresada en su membrana celular que interacciona fuertemente con el poliestireno que recubre las placas.

De esta manera, las CMSP descongeladas y resuspendidas en medio completo a una densidad celular de  $5 \cdot 10^6$  cél/ml se sembraron en placas de 6 pozos a razón de 3 ml/pozo. Las células sembradas se incubaron durante 1 h en estufa gaseada, período en el cual se logró la adhesión de los monocitos presentes en la muestra al fondo de la placa de cultivo. Luego, se lavaron dos veces con 1 ml de medio basal, con el objetivo de remover aquellas células débilmente unidas a la placa (por ejemplo, linfocitos B). Las poblaciones de células no adherentes (predominantemente linfocitaria) fueron criopreservadas (según la metodología detallada en la sección 6.3) hasta su posterior uso.

#### **11.4.2. Diferenciación de monocitos a células dendríticas inmaduras**

Los monocitos que se encontraban adheridos a la placa de cultivo fueron incubados con medio RPMI completo suplementado con rhGM-CSF (Gema Biotech, Argentina) 100 ng/ml y rhIL-4 (Millipore, EE. UU.) 10 ng/ml durante un período de 6 días. Al tercer día de incubación

se realizó el agregado de medio de cultivo fresco con el doble de concentración de rhGM-CSF e rhIL-4, con el fin de renovar los nutrientes y las citoquinas mencionadas. Durante este período de incubación, los monocitos adherentes se lograron diferenciar a células dendríticas inmaduras en suspensión.

#### **11.4.3. Maduración de células dendríticas**

Las células dendríticas inmaduras fueron colectadas en microtubos de 1,5 ml, centrifugadas a 200 x g durante 20 min y resuspendidas en medio de cultivo RPMI completo suplementado con rhGM-CSF e rhIL-4. Se tomó una pequeña alícuota de esta muestra para hacer un recuento y determinar el número de células y la viabilidad celular, según la metodología que se describe en la sección 6.2. En una placa de 48 pozos se sembraron 30000 cél/pozo y se añadieron luego, a una concentración de 200 µg/ml, las distintas variantes de GMOP-IFN: GMOP-IFN $\alpha$ 2b, GMOP-IFN $\alpha$ 2b-VAR2 y GMOP-IFN $\alpha$ 2b-VAR3. Se adicionó medio de cultivo RPMI completo, suplementado con rhGM-CSF e rhIL-4, hasta un volumen final de 100 µl. El control negativo se realizó con PBS. Cada condición fue evaluada por triplicado.

A las 16 h de incubación, se realizó un cambio de medio de cultivo por medio RPMI completo suplementado con rhGM-CSF e rhIL-4 en las concentraciones antes mencionadas, agregando además el factor de necrosis tumoral alfa humano recombinante (rhTNF- $\alpha$ , Prospec, Israel) 20 ng/ml, en un volumen final de 200 µl. Se incubó durante 24 h.

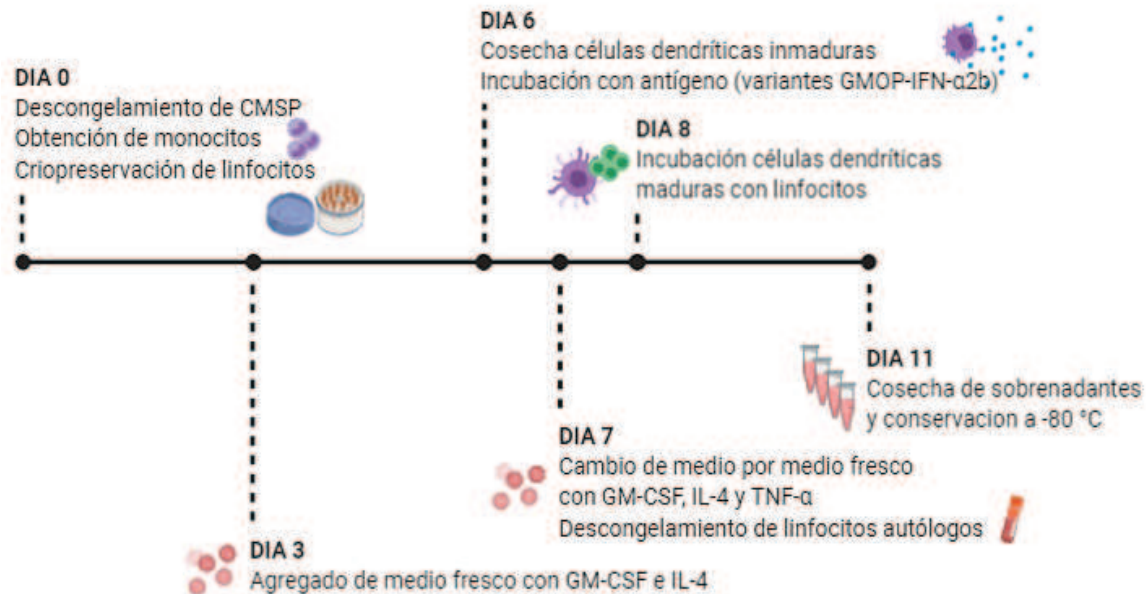
#### **11.4.4. Incubación de las células dendríticas maduras con los linfocitos T autólogos**

Luego de realizar el cambio de medio de cultivo de las células dendríticas para promover su maduración, se descongeló la muestra de células mononucleares enriquecida en linfocitos (criopreservada luego del aislamiento de los monocitos; sección 11.4.1 de este apartado), se resuspendió en 9 ml de medio de cultivo RPMI completo y se sembró en una placa de 6 pozos a razón de 3 ml/pozo.

Al día siguiente se cosecharon los linfocitos, se centrifugaron durante 15 min a 200 x g y se resuspendieron en 3 ml de medio de cultivo RPMI completo suplementado con rhIL-2 (2 ng/ml), para promover la proliferación linfocitaria. Simultáneamente, se realizó un cambio de medio de las células dendríticas por medio RPMI completo suplementado con la misma citoquina. Por último, las células dendríticas maduras se incubaron con los linfocitos en una relación 1:30 (dendríticas:linfocitos), logrando una densidad celular total de aproximadamente  $9.10^5$  cél/pozo, en 150 µl de volumen final. Para evaluar la competencia linfocitaria se realizó

un control positivo empleando lectinas de *Phaseolus vulgaris* (Sigma, EE. UU.) como agente mitógeno inespecífico, a una concentración de 1 µg/ml.

A las 72 h, se realizó la cosecha de los sobrenadantes de cada uno de los pozos, los cuales fueron centrifugados a 200 x g durante 20 min con el objetivo de eliminar los detritos celulares. Los sobrenadantes de cultivo clarificados fueron conservados a -80 °C hasta su posterior evaluación por ELISA sándwich. El esquema de trabajo llevado adelante se resume en la Figura 11.



**Figura 11.** Esquema de trabajo diseñado para los ensayos de linfo-activación. La descripción de las tareas desarrolladas durante cada etapa se encuentra en el texto precedente (sección 11).

### 11.5. Cuantificación de IFN-γ en sobrenadantes de cultivo por medio de ELISA sándwich

El ensayo de ELISA sándwich para la detección de IFN-γ se basa en la captura del IFN gamma humano por parte del mAb anti-IFN-γ humano (mAb  $\bar{\alpha}$ -hIFN-γ) inmovilizado sobre placas de poliestireno. Posteriormente se realiza una incubación con la muestra y finalmente la citoquina es detectada por medio de un mAb anti-hIFN-γ biotinilado (biotin-mAb  $\bar{\alpha}$ -hIFN-γ) el cual es reconocido por el conjugado estreptavidina-peroxidasa. El revelado de la reacción se realiza agregando el sustrato de la enzima junto con un cromógeno.

Las etapas del protocolo se describen a continuación:

**Sensibilización:** se sensibilizaron placas de poliestireno de fondo plano de 96 pozos (Greiner, Austria) con 100 µl por pozo de una solución de 2 µg/ml del mAb  $\bar{\alpha}$ -hIFN-γ NIB42 (BD, EE. UU.) en solución de sensibilización [solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> 50 mM pH 9,6]. Se incubó durante 1 h a 37 °C y luego durante la noche a 4 °C.

**Bloqueo:** el bloqueo de los sitios de interacción inespecífica se realizó con 200  $\mu$ l por pozo de solución de bloqueo [solución de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma, EE. UU.) 1% (P/V) en PBS]. Se incubó durante 1 h a 37 °C.

**Primera incubación:** en cada pozo se añadieron 100  $\mu$ l de diluciones sucesivas 1:2 del estándar de rhIFN- $\gamma$  (BD, EE. UU.), desde 20 ng/ml hasta 0,15 ng/ml, en solución diluyente [solución de BSA 0,1% (P/V) en PBS con el agregado de Tween 20 al 0,05% (V/V)]. Los sobrenadantes de cultivo de los ensayos de linfo-activación se sembraron puros. Se realizó un control negativo para evaluar la posible unión inespecífica de los reactivos, sembrando 100  $\mu$ l de solución diluyente, por triplicado. Se incubó durante 2 h a 37 °C.

**Segunda incubación:** se agregaron 100  $\mu$ l por pozo de una solución del mAb  $\bar{\alpha}$ -hIFN- $\gamma$  biotinilado 4S.B3 (BD, EE. UU.) 0,5  $\mu$ g/ml en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37 °C.

**Tercera incubación:** se agregaron 100  $\mu$ l por pozo de una solución del conjugado streptavidina-peroxidasa: Amdex (Sigma, EE. UU.) en una dilución 1:5000 en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37 °C.

**Reacción reveladora:** se repitió el procedimiento indicado en la sección 7.1.

**Cuantificación:** se graficaron los valores de absorbancia en función de las concentraciones de rhIFN- $\gamma$  empleado como estándar, en escala logarítmica. La concentración de las muestras se determinó interpolando los valores de absorbancia en la zona lineal de la curva estándar.

Todas las incubaciones se llevaron a cabo en cámara húmeda. Después de cada etapa se realizaron cinco lavados con solución de lavado [solución de PBS con el agregado de Tween 20 (Bio Basic, Canadá) al 0,05% (V/V)].

### **11.6. Índices de estimulación**

La magnitud de la activación de los linfocitos T en cada muestra de CMSP, frente a las distintas variantes del GMOP-IFN, se estableció como un índice de estimulación (IE). El IE se define como el cociente entre la concentración de citoquina en la muestra y el valor correspondiente al control negativo. Finalmente se evaluó el porcentaje de muestras (donantes) que, al ser desafiados con las variantes de-inmunizadas, presentaron IE inferiores que aquellos obtenidos al desafiarlos con la proteína GMOP-IFN original. Los datos fueron analizados mediante el método de análisis de la varianza (ANOVA) y posterior test de comparación múltiple de Tukey, considerando la existencia de diferencias significativas entre muestras cuando  $p \leq 0,05$ .

### **11.7. Evaluación de la restricción de HLA-DR**

Para verificar que la presentación antigénica esté mediada por las moléculas del HLA-DR, células dendríticas derivadas de tres donantes respondedores a GMOP-IFN, fueron estimuladas con dicha proteína y cultivadas en las condiciones descritas en la sección 11.4 hasta el día 7 (ver esquema de trabajo en la Figura 11). Se realizó un control negativo con PBS.

Posteriormente, durante el día 8 del protocolo y previo al enfrentamiento con la muestra de linfocitos T autólogos, las células dendríticas maduras obtenidas se cosecharon, realizando el cambio de medio correspondiente a medio de cultivo RPMI completo suplementado con rHL-2 (2 ng/ml), y se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti-HLA-DR (ThermoFisher, EE.UU.) en las condiciones: 0 µg/ml, 10 µg/ml y 20 µg/ml, durante 1h. Por último, estas células dendríticas maduras se enfrentaron a los linfocitos en una relación 1:30 (dendríticas:linfocitos), logrando una densidad celular total de aproximadamente  $9.10^5$  cél/pozo, en 150 µl de volumen final. De igual manera que en los ensayos previos, para evaluar la competencia linfocitaria se realizó un control positivo empleando lectinas de *Phaseolus vulgaris* (Sigma, EE. UU.) como agente mitógeno inespecífico, a una concentración de 1 µg/ml. Cada condición fue evaluada por triplicado.

## **12. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE IN VIVO**

Para el estudio de la respuesta inmune *in vivo*, se emplearon ratones transgénicos cuyo sistema de presentación antigénica endógeno (H2 de Clase I y II) se ha eliminado y reemplazado por los alelos que codifican para proteínas del CMH humano, específicamente HLA-A\*0201 y HLA-DRB1\*0101. Estos animales fueron gentilmente provistos por el Instituto Pasteur (París, Francia) y su crianza y reproducción se realizó en el Centro de Medicina Comparada (CMC) perteneciente al Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICIVET-Litoral).

Los protocolos de inmunización consistieron en tres inoculaciones intraperitoneales con 25 µg de cada proteína (GMOP-IFN, GMOP-IFN-VAR2, GMOP-IFN-VAR3) espaciadas por intervalos de 14 días. Los ratones se dividieron en cuatro grupos conformados por seis animales cada uno, uno por cada proteína a evaluar más un grupo control. En la primera dosis cada ratón se inoculó con 400 µl de una emulsión preparada al mezclar 200 µl de solución de la proteína diluida en PBS (o sólo PBS para el grupo control) con 200 µl de adyuvante completo de Freund (Sigma, EE. UU.). La segunda inoculación se realizó en idénticas condiciones, pero empleando el adyuvante incompleto de Freund (Sigma, EE. UU.). La tercera y última

inoculación consistió en 200 µl de solución de la proteína diluida en PBS (o sólo PBS para el grupo control), sin el agregado de adyuvante.

Luego de transcurridos 7 días desde la última inoculación se realizaron extracciones de sangre periférica empleando heparina sódica como agente anticoagulante (Fada Pharma, Argentina) y se sacrificaron todos los animales. A partir de las muestras de sangre se separó el plasma por centrifugación a 5000 rpm durante 5 min y se conservó a -70 °C para su posterior evaluación en ensayos de ELISA indirecto (sección 12.1).

### **12.1. Cuantificación de anticuerpos totales $\bar{\alpha}$ -rhIFN- $\alpha$ 2b en plasma de ratones inmunizados con las distintas variantes de GMOP-IFN mediante ELISA indirecto**

La técnica de ELISA indirecto para evaluar la producción de anticuerpos contra las variantes analizadas se basó en la sensibilización de las placas de microtitulación con la proteína de interés (GMOP-IFN, GMOP-IFN-VAR2 o GMOP-IFN-VAR3), seguida de la incubación con las muestras de plasma de ratón y posterior detección de anticuerpos unidos mediante un pAb anti-Igs de ratón conjugado a peroxidasa.

Las etapas del protocolo desarrollado fueron las siguientes:

**Sensibilización:** se sensibilizaron placas de poliestireno de fondo plano de 96 pozos (Greiner, Austria) con 100 µl por pozo de una solución de 1 µg/ml de la proteína utilizada para la inoculación de los ratones (GMOP-IFN, GMOP-IFN-VAR2 o GMOP-IFN-VAR3) en solución de sensibilización [solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> 50 mM pH 9,6]. Se incubó durante 1 h a 37 °C y luego durante la noche a 4 °C.

**Bloqueo:** el bloqueo de los sitios de interacción inespecífica se realizó con 200 µl por pozo de solución de bloqueo [solución de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma, EE. UU.) 1% (P/V) en PBS]. Se incubó durante 1 h a 37 °C.

**Primera incubación:** en cada pozo se añadieron 100 µl de diluciones sucesivas 1:2 de las muestras de plasma de ratón diluidas 1/50 en solución diluyente [solución de BSA 0,1% (P/V) en PBS con el agregado de Tween 20 al 0,05% (V/V)]. Se realizó un control negativo para evaluar la posible unión inespecífica de los reactivos, sembrando 100 µl de solución diluyente, por triplicado. Se incubó durante 1 h a 37 °C.

**Segunda incubación:** en cada pozo se agregaron 100 µl de una solución de pAb  $\bar{\alpha}$ -Igs de ratón conjugado a peroxidasa P0260 (Aglient, DAKO, EE.UU.) en una dilución 1:2000 en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37 °C.

**Reacción reveladora:** se repitió el procedimiento indicado en la sección 7.1.



Todas las incubaciones se llevaron a cabo en cámara húmeda. Después de cada etapa se realizaron cinco lavados con solución de lavado [solución de PBS con el agregado de Tween 20 (Bio Basic, Canadá) al 0,05% (V/V)].

**Cuantificación:** se graficaron los valores de absorbancia en función de las diluciones del plasma en escala logarítmica y se realizó un ajuste de los puntos obtenidos (curva sigmoideal). La primera dilución del plasma que presentó una absorbancia por encima del valor de *cut off* (definido como el promedio del valor del control negativo más tres desviaciones estándar) fue considerada como el título de la muestra. Los datos fueron analizados mediante el método de análisis de la varianza (ANOVA) y posterior test de comparación múltiple de Tukey, considerando la existencia de diferencias significativas entre muestras cuando  $p \leq 0,05$ .

### **12.2. Evaluación del título de anticuerpos neutralizantes contra las distintas variantes de GMOP-IFN en plasma de ratones por medio de ensayos de inhibición de la ABAV**

Con el objetivo de determinar el título de anticuerpos capaces de neutralizar la ABAV *in vitro* del IFN en el plasma de ratones inmunizados con las distintas variantes de GMOP-IFN, se realizaron ensayos de inhibición de la actividad protectora.

Se llevaron a cabo ensayos de valoración biológica antiviral (sección 9.1.1) realizando una pre-incubación (con diluciones seriadas 1:2) del plasma de ratón con una concentración constante de la variante de GMOP-IFN correspondiente. De esta manera, aquellos anticuerpos capaces de reconocer y unir al IFN en su sitio activo reducirán la capacidad protectora de la citoquina. Dicha reducción será más evidente en aquellos pocillos en los que el IFN se haya incubado con el plasma más concentrado, observándose mayor lisis celular. En contraste, aquellos pocillos pre-incubados con diluciones mayores de plasma presentarán mayor efector protector y por ende mayor viabilidad celular.

En una placa de cultivo estéril de 96 pozos se realizaron diluciones seriadas 1:2 de las muestras de plasma de ratón, partiendo de diluciones iniciales 1:50, con volumen final de 50  $\mu$ l. Luego se agregaron 50  $\mu$ l de la solución de proteína (GMOP-IFN, GMOP-IFN-VAR2 o GMOP-IFN-VAR3, según corresponda) con una actividad volumétrica de 5 UI/ml. Todas las diluciones se realizaron en medio de ensayo (medio MEM suplementado con SFB 2% (V/V)). La placa se incubó durante 1 h a 37 °C y luego las mezclas plasma-IFN pre-incubadas se transfirieron (100  $\mu$ l/pozo) a placas de cultivo con células MDBK sembradas (ver sección 9.1.1). Además, se realizaron un control de lisis (células no tratadas con IFN), un control de crecimiento (células no tratadas con IFN ni con virus) y una curva control sembrando cada variante de GMOP-IFN

sin pre-incubar, desde una actividad volumétrica de 20 UI/ml hasta 0,156 UI/ml. Luego, la placa se incubó durante 6 h a 37 °C.

Posteriormente se procedió con el ensayo de ABAV según se detalló previamente en el apartado 9.1.1.

Se graficaron los datos de absorbancia en función de las diluciones del plasma en escala logarítmica y se calculó el título correspondiente como la inversa del valor de la dilución necesaria para producir una inhibición del 50% de la actividad protectora del IFN. Los datos fueron analizados mediante el método de análisis de la varianza (ANOVA) y posterior test de comparación múltiple de Tukey, considerando la existencia de diferencias significativas entre muestras cuando  $p \leq 0,05$ .

## »» RESULTADOS

## 1. DISEÑO DE VARIANTES DE-INMUNIZADAS DE GMOP-IFN MEDIANTE ALGORITMOS DE PREDICCIÓN IN SILICO

En el desarrollo de una respuesta efectiva mediada por linfocitos T frente a una proteína, la unión de los péptidos provenientes del procesamiento antigénico a las moléculas del CMH humano constituye un evento crítico. En efecto, la fuerza de estas uniones en su conjunto representa una medida de la inmunogenicidad de la proteína completa [85]. Con el objetivo de estudiar la inmunogenicidad potencial de GMOP-IFN, se realizó un análisis minucioso de su secuencia de aminoácidos, empleando el conjunto de herramientas inmunoinformáticas *EpiMatrix* [153]. Este estudio reveló la presencia de un gran contenido de epitopes potencialmente inmunogénicos y promiscuos en la proteína (Figura 12.A). La siguiente etapa de dicho estudio consistió en agruparlos formando péptidos de entre 15 y 25 aminoácidos, por medio de la utilización del algoritmo *ClustiMer*. A partir de este análisis se identificaron seis clústeres, es decir seis regiones que presentan gran contenido de epitopes con elevada probabilidad de unión a las moléculas del HLA. Los clústeres de GMOP-IFN abarcan los residuos aminoacídicos: 20-43, 58-72, 70-89, 121-141, 131-154, 158-179; cinco de los cuales se solapan con secuencias previamente reportadas como epitopes para células T en la bibliografía [154].

En la Tabla 2 se presenta un resumen de la información correspondiente a cada clúster identificado, incluyendo su ubicación dentro de la secuencia de GMOP-IFN; la secuencia de cada epitope peptídico (aminoácidos resaltados en negrita) junto a los tres residuos que lo flanquean en dirección N-terminal y C-terminal, ya que contribuyen a la estabilidad de unión a las moléculas del HLA-II; el número de *hits*, esto es, el número de valores Z de la escala de *EpiMatrix* que estén por encima de 1,64; y un valor de *score* asignado a cada clúster, que deriva del número de *hits* normalizado según el tamaño del clúster.

**Tabla 2.** Características de los clústeres inmunogénicos presentes en la secuencia de GMOP-IFN

<i>Ubicación del clúster</i>	<i>Secuencia del clúster</i>	<i>Número de hits de EpiMatrix</i>	<i>Score de EpiMatrix</i>
20 - 43	THSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSC	17	26,17
58 - 72	GNQ <b>FQKAET</b> IPVLHE	8	16,92
70 - 89	LHEMI <b>QQIFN</b> L <b>FSTK</b> DSSAA	17	32,33
121 - 141	ETPLMKED <b>SILAVR</b> KYFQRIT	8	11,12
131 - 154	LAVRKYFQRITL <b>YLKEK</b> KYSPCAW	18	27,89
158 - 179	RAEIMRSFSL <b>STNLQ</b> ESLRSKE	18	28,55

La última etapa del análisis *in silico* consistió en el estudio de la contribución individual de cada aminoácido en la inmunogenicidad del péptido completo. Para lograrlo, se realizó un reemplazo iterativo de cada residuo por los 19 restantes y se evaluó la inmunogenicidad resultante en cada caso. En esta instancia se analizó, mediante un “apilamiento” de secuencias homólogas a la de interés, la posibilidad de realizar cambios conservativos o naturales en la molécula, con el fin de evitar posibles interrupciones estructurales y/o funcionales en la misma.

A partir de la información colectada del análisis descripto y el conocimiento procedente de la bibliografía en relación a la identificación de aquellos residuos críticos para la estructura y actividad del hIFN- $\alpha$ 2b [29,39,155–157], fue posible diseñar las diferentes versiones de-inmunizadas de GMOP-IFN. Dichas variantes se construyeron a partir de la introducción de hasta diez mutaciones en su secuencia, en diferentes combinaciones. Inicialmente, se identificó la mínima cantidad de sustituciones factibles de ser introducidas en cada clúster que permitan lograr una reducción significativa en el *score* de inmunogenicidad según las predicciones arrojadas por el algoritmo *Optimatix*, sin generar una gran interrupción estructural y/o funcional de la proteína. Sin embargo, se ha demostrado que las modificaciones que generan cambios conservativos en la molécula pueden dar lugar al desarrollo de un nuevo conjunto de células T que reconozcan diferentes residuos accesibles al TCR dentro del mismo epítopo peptídico [158], sin lograr por lo tanto una reducción considerable en la afinidad de unión péptido-molécula CMH-II. De esta manera, el criterio en la elección de los cambios a introducir en la molécula se basó en la disminución de la afinidad de unión a las distintas moléculas del CMH-II evitando la generación de alteraciones significativas en la estructura de la citoquina.

Las regiones hipervariables de las moléculas del CMH-II se corresponden con bolsillos específicos en el interior de la molécula, capaces de unir las cadenas laterales de los fragmentos peptídicos. Además, cada bolsillo se encuentra asociado a una especificidad química relativamente estrecha [159]. Teniendo en cuenta también que las células T restringidas por HLA-II generalmente interactúan con aminoácidos con cadenas laterales de gran tamaño y carga, se decidió realizar sustituciones denominadas de “bajo perfil”, como lo es la sustitución por Ala. Sin embargo, se consideró la introducción de la mutación I161T, debido a la marcada disminución que produjo en el *score* de inmunogenicidad de *Optimatix*, con respecto a la modificación I161A.

En la Tabla 3 se describen las modificaciones introducidas en cada una de las variantes de-inmunizadas. En la molécula denominada GMOP-IFN-VAR1 se incluyeron el total de las mutaciones propuestas por el análisis *in silico*, con el propósito de reducir simultáneamente los *scores* de inmunogenicidad en los seis clústeres de la proteína. En base a estudios previos

realizados por nuestro grupo de trabajo [39] se determinó que cinco de estas sustituciones fueron relevantes en la unión de péptidos derivados del hIFN- $\alpha$ 2b a diferentes moléculas del HLA-II (L9A, F47A, L117A, F123A y L128A). Por este motivo, estas modificaciones se consideraron en el desarrollo de la muteína denominada GMOP-IFN-VAR2. Por último, se diseñaron otras dos variantes con dos mutaciones adicionales a las de GMOP-IFN-VAR2 (siete sustituciones en total). De esta manera, en la proteína GMOP-IFN-VAR3 se incluyeron las modificaciones I161T y L171A, que producen un impacto en la inmunogenicidad del clúster 158-179, mientras que para el diseño de la muteína GMOP-IFN-VAR4 se incluyeron las mutaciones L142A y F137A, las cuales generan una disminución en el *score* predicho para el clúster 70-89.

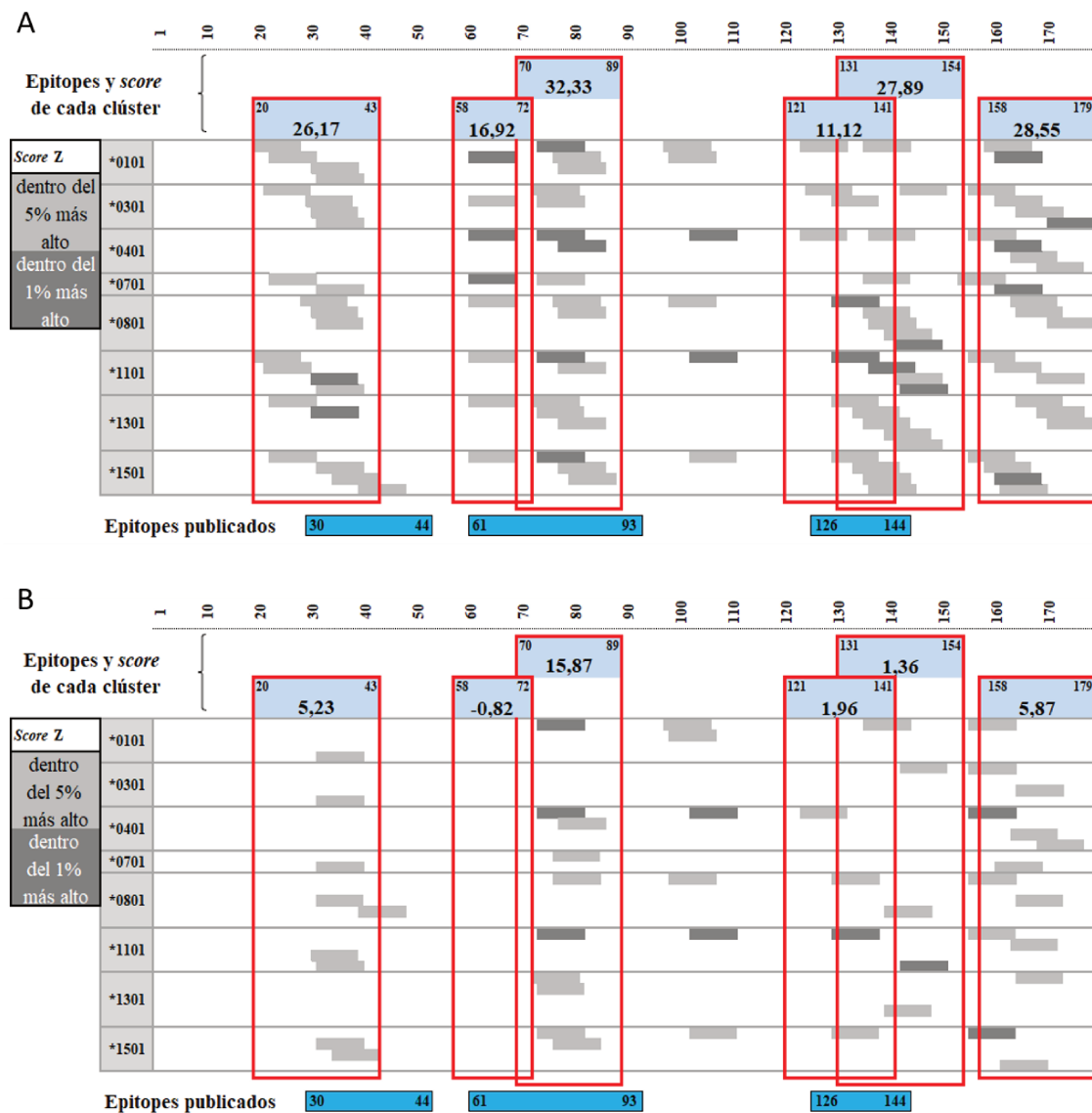
**Tabla 3.** Mutaciones introducidas en la secuencia aminoacídica del GMOP-IFN para generar las diferentes versiones de-inmunizadas

<b>Variantes de GMOP-IFN</b>	<b>Mutaciones</b>
<b>VARIANTE 1</b>	L23A - L31A - F61A - N79A - L80A - L131A - L142A - F137A - I161T - L171A
<b>VARIANTE 2</b>	L23A - F61A - L131A - L142A - F137A
<b>VARIANTE 3</b>	L23A, F61A, L131A, L142A, F137A, I161T, L171A
<b>VARIANTE 4</b>	L23A - F61A - N79A - L80A - L131A - L142A - F137A

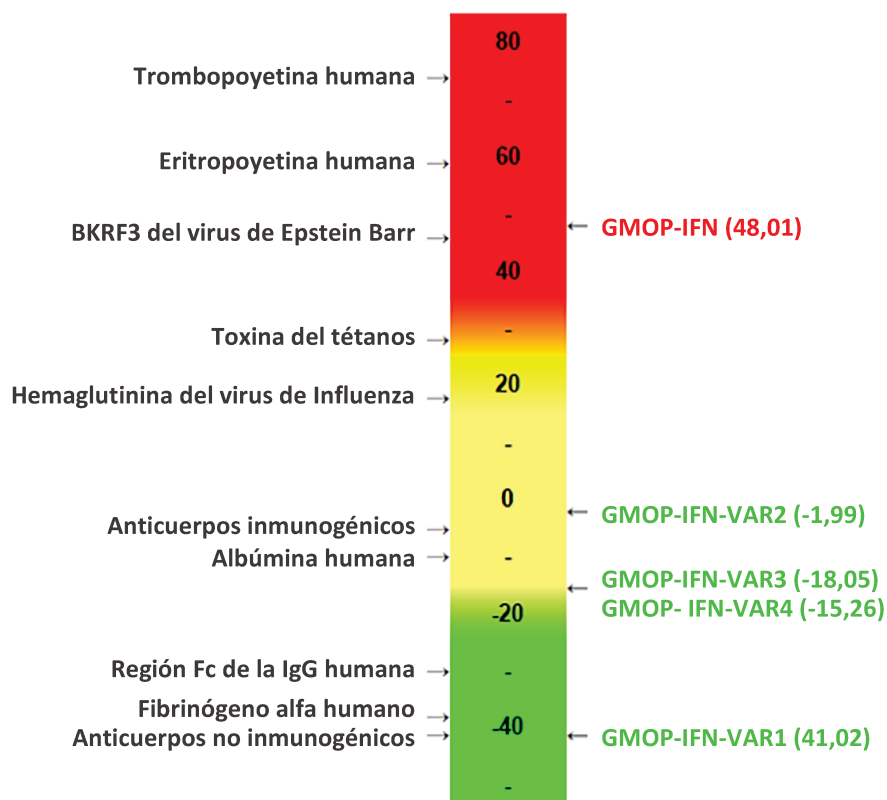
En la Figura 12 se muestra una representación gráfica de los resultados obtenidos a partir del análisis *in silico* de GMOP-IFN original (Figura 12.A) y de su versión completamente de-inmunizada (Figura 12.B) correspondiente a GMOP-IFN-VAR1, en la que se introdujeron un total 10 mutaciones puntuales tendientes a reducir el *score* de inmunogenicidad de los seis clústeres identificados. Como se puede observar en la figura correspondiente a la proteína de-inmunizada, las modificaciones propuestas conducen a una marcada reducción en la densidad de *hits* (péptidos presentan una probabilidad significativa de unión a la molécula del CMH-II), así como en el *score* de inmunogenicidad predicho para cada clúster.

Una vez diseñadas las muteínas, se realizó un último análisis *in silico* de la inmunogenicidad global de GMOP-IFN y de las variantes de-inmunizadas. En la Figura 13 se representan los valores de *score* predichos por *EpiMatrix* para cada una de las proteínas, en una escala de inmunogenicidad en la que se ubican además algunos péptidos y proteínas como referencia, desde aquellos que presentan mayor inmunogenicidad (rojo) hacia los de menor inmunogenicidad (verde). Se puede observar en dicha figura una marcada reducción en los

scores correspondientes a las variantes de-inmunizadas, en comparación al valor asignado a la proteína original.



**Figura 12.** Análisis *in silico* de la inmunogenicidad de GMOP-IFN. A) Agrupamiento de las regiones inmunogénicas o clústeres (recuadros color rojo) identificados según las predicciones de *EpiMatrix*, con sus respectivos *scores* de inmunogenicidad. Los rectángulos grises, alineados a lo largo de la secuencia de GMOP-IFN, señalan la localización de aquellos péptidos que presentan mayor probabilidad de unión a las moléculas del HLA, para los 8 alelos arquetípicos de mayor prevalencia en la población mundial, en la secuencia de GMOP-IFN (fila superior). Aquellos péptidos cuyo *score* es mayor a 1,64 en la escala “Z” de *EpiMatrix* (el 5% más alto) son considerados potenciales epitopes (rectángulos color gris claro); los péptidos con valores de *score* superiores a 2,32 en la escala (el 1% más alto) presentan elevadas probabilidades de unión a las moléculas del HLA (rectángulos color gris oscuro). En la parte inferior de la figura se muestra la ubicación de los epitopes previamente publicados (recuadros color celeste). B) Predicción del impacto de las mutaciones seleccionadas en la inmunogenicidad global de GMOP-IFN.



**Figura 13.** Escala de inmunogenicidad global de *EpiMatrix*. Localización de GMOP-IFN y sus variantes de-inmunizadas en la escala de inmunogenicidad potencial, en función de sus *scores* globales de inmunogenicidad. Estos valores representan la desviación en el contenido potencial de epitopes con respecto a un valor de referencia, basado en un conjunto aleatorio de péptidos estándar. Aquellas proteínas con *score* superior a 10 son considerados como potencialmente inmunogénicas.

## 2. GENERACIÓN DE LAS VARIANTES DE-INMUNIZADAS DE GMOP-IFN

### 2.1. Construcción de los plásmidos pLV-PLK conteniendo las diferentes variantes de GMOP-IFN

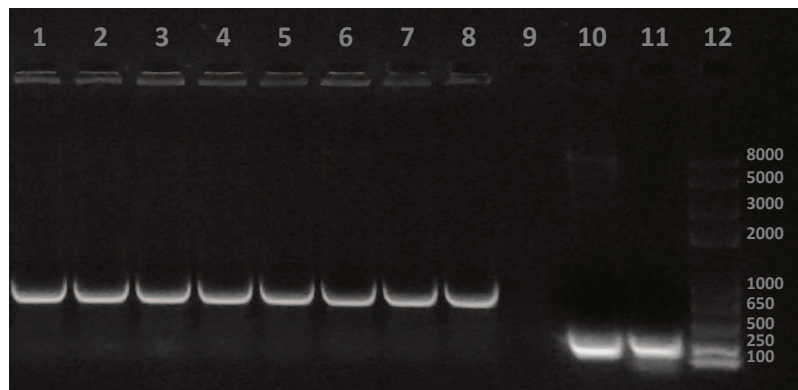
En las secuencias de ADN diseñadas para el clonado de cada molécula se incorporaron los sitios de restricción para las enzimas *Xba*I y *Sal*I, que se encuentran también en los vectores de expresión utilizados. Se eligieron particularmente dichas enzimas de restricción debido a que ambas emplean la misma solución de reacción, lo cual posibilita obtener mayor eficiencia en los procesos de digestión y también lograr un ahorro de tiempo al momento de realizar el procedimiento. Se agregó además la secuencia de señalización del hGM-CSF, con el objetivo de asegurar la correcta secreción de las proteínas al sobrenadante de cultivo.

Los vectores lentivirales conteniendo la secuencia nucleotídica de cada una de las variantes de GMOP-IFN fueron generados mediante el clonado de las secuencias correspondientes, contenidas inicialmente en plásmidos pUC57-Kan, en vectores de



transferencia de sistemas lentivirales de tercera generación (pLV-PLK). Los productos de las reacciones de ligación de los insertos con el plásmido pLV-PLK se emplearon para la transformación de bacterias *E. coli* TOP10 competentes. Las bacterias transformadas fueron sembradas en placas conteniendo medio LB-agar suplementado con ampicilina, a fin de seleccionar sólo aquellas bacterias que incorporaron el plásmido con el transgén de interés.

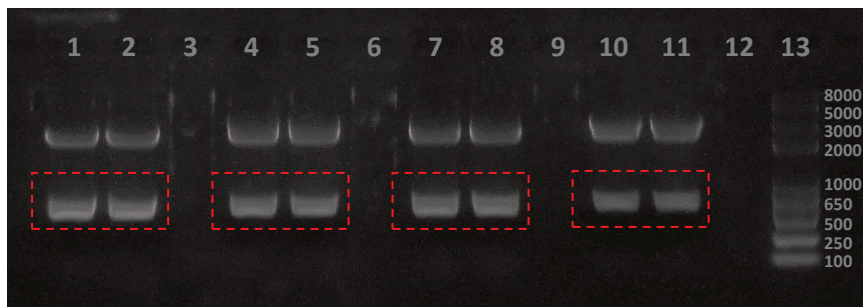
La presencia de clones positivos se determinó mediante ensayos de PCR a partir de colonias bacterianas, analizando dos colonias por cada variante. Los productos de dichas reacciones fueron analizados mediante corrida electroforética en geles de agarosa. Los fragmentos de ADN observados, de aproximadamente 650 pb, confirmaron la obtención de clones positivos para cada variante (Figura 14).



**Figura 14.** Electroforesis en gel de agarosa de las muestras provenientes del ensayo de PCR en colonia para los vectores pLV-PLK conteniendo las secuencias de las variantes de-inmunizadas de GMOP-IFN. La presencia de un fragmento de ADN con el tamaño esperado permitió confirmar la obtención de clones bacterianos que contienen los vectores lentivirales recombinantes de interés. Calles: **1-2:** Clones pLV-PLK-GMOP-IFN-VAR1; **3-4:** Clones pLV-PLK-GMOP-IFN-VAR2; **5-6:** Clones pLV-PLK-GMOP-IFN-VAR3; **7-8:** Clones pLV-PLK-GMOP-IFN-VAR4; **10:** Control vector religado; **11:** Control negativo; **12:** Marcador de masa molecular.

Luego, con el fin de confirmar la presencia del transgén de interés, se realizó minipreparación de ADN plasmídico a partir de los clones que resultaron positivos en el ensayo de PCR en colonia. Los vectores obtenidos fueron sometidos a digestión con las enzimas de restricción *Xba*I y *Sal*I y los productos de la reacción fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa. Como se puede observar en la Figura 15, la presencia de una banda de aproximadamente 650 pb para todos los vectores evaluados, permitió confirmar que la secuencia de interés se encontraba correctamente clonada en cada vector. Estos clones bacterianos fueron criopreservados y se escogió uno de cada construcción con el fin de realizar maxipreparaciones de ADN plasmídico para su posterior empleo en la generación de líneas celulares productoras de las proteínas de interés. Asimismo, la presencia e identidad de las

secuencias en cada una de las nuevas variantes se confirmó posteriormente mediante secuenciación.



**Figura 15.** Electroforesis en gel de agarosa de muestras de minipreparación de ADN plasmídico derivadas de clones bacterianos que contienen las secuencias codificantes de las variantes de GMOP-IFN, digeridas con las enzimas de restricción *XbaI/SalI*. La obtención de un fragmento de aproximadamente 650 pb confirmó la presencia de los insertos de interés (recuadros rojos). Calles: **1-2:** GMOP-IFN-VAR1; **4-5:** GMOP-IFN-VAR2; **7-8:** GMOP-IFN-VAR3; **10-11:** GMOP-IFN-VAR4; **13:** Marcador de masa molecular.

## **2.2. Generación de líneas celulares productoras de las variantes de-inmunizadas de GMOP-IFN**

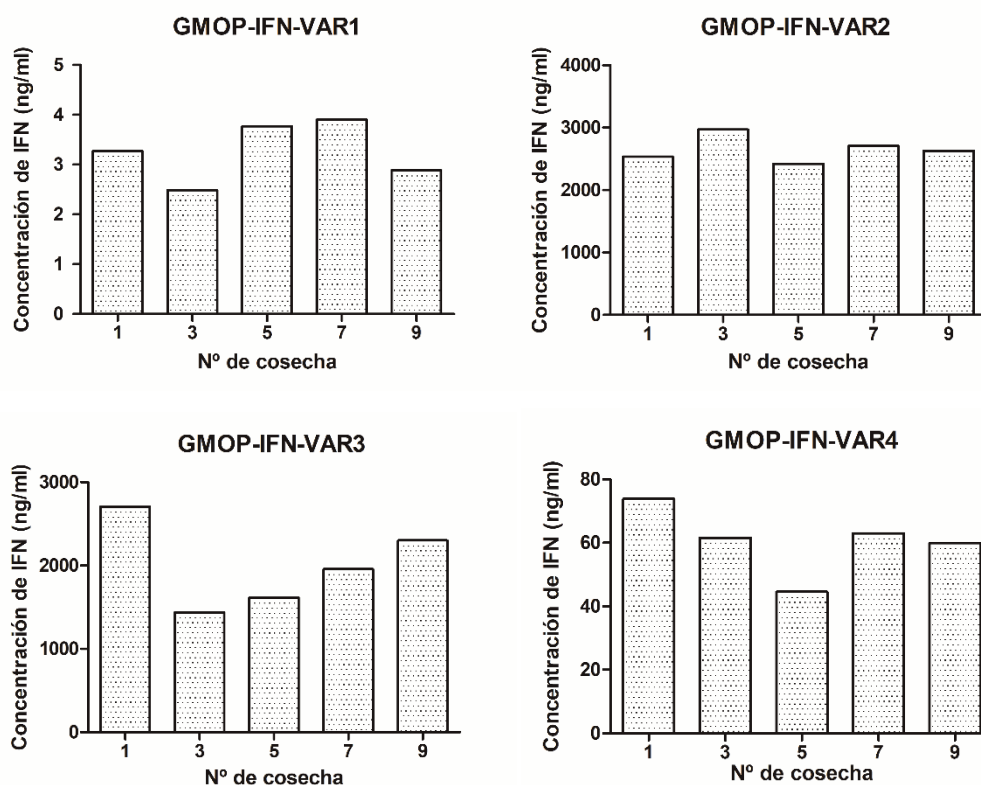
Existen diversas metodologías que permiten llevar a cabo la introducción del material genético de interés en el genoma celular. Sin embargo, solo unas pocas permiten obtener de manera eficiente líneas celulares estables, con elevada producción específica de la proteína exógena. En este sentido, el sistema de transferencia del material genético mediante el uso de partículas lentivirales presenta elevada efectividad, debido a que permite la integración del *cassette* de expresión en regiones del genoma transcripcionalmente activas [160].

Con el objetivo de obtener líneas celulares estables productoras de las variantes de-inmunizadas de GMOP-IFN, en una primera instancia, se ensamblaron partículas lentivirales en células HEK 293T/17, por transfección mediada por lípidos catiónicos. Posteriormente, se cosecharon los sobrenadantes de cultivo conteniendo las partículas lentivirales y se utilizaron para transducir células CHO-K1.

Con el fin de enriquecer el cultivo con aquellas células que presentaron mayores niveles de expresión de las proteínas de interés, las líneas celulares fueron sometidas a un proceso de presión selectiva con concentraciones crecientes de puromicina (agente de selección cuyo gen de resistencia se encuentra en el vector de transferencia). Todos los cultivos celulares se comenzaron a presionar con una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  de antibiótico, la cual se fue aumentando de manera gradual hasta observar la muerte de todas las células. Estudios preliminares de *western blot*, ELISA sándwich y actividad biológica antiviral, demostraron la identidad de las proteínas producidas por tales cultivos, aunque con

amplias variaciones en cuanto a la cantidad y actividad antiviral de las mismas. Las líneas celulares seleccionadas fueron luego cultivadas en condiciones de adherencia con el objetivo de escalar la producción y obtener suficiente cantidad de cada proteína para los ensayos de caracterización posteriores.

A los fines de monitorear la etapa de producción, se determinó la concentración de las variantes de GMOP-IFN en los sobrenadantes de cultivo correspondientes a las cosechas 1, 3, 5, 7 y 9 mediante ELISA sándwich (Figura 16). Luego de 10 cosechas los cultivos celulares fueron discontinuados.



**Figura 16.** Concentración de las variantes de-inmunizadas de GMOP-IFN en los sobrenadantes de cultivo. Por medio de ELISA sándwich, se determinó la concentración de las distintas variantes de GMOP-IFN en cinco cosechas, obtenidas en el transcurso de la etapa de producción de cada proteína.

Resulta conveniente destacar la diferencia en la concentración de proteína en los sobrenadantes de cultivo de las líneas celulares productoras de GMOP-IFN-VAR1 y GMOP-IFN-VAR4 ( $3,3 \pm 0,6$  ng/ml y  $60 \pm 10$  ng/ml, respectivamente) con respecto a los obtenidos para GMOP-IFN-VAR2 y GMOP-IFN-VAR3 ( $2700 \pm 200$  ng/ml y  $2000 \pm 500$  ng/ml, respectivamente).

### **3. PURIFICACIÓN DE LAS VARIANTES DE GMOP-IFN MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE INMUNOAFINIDAD**

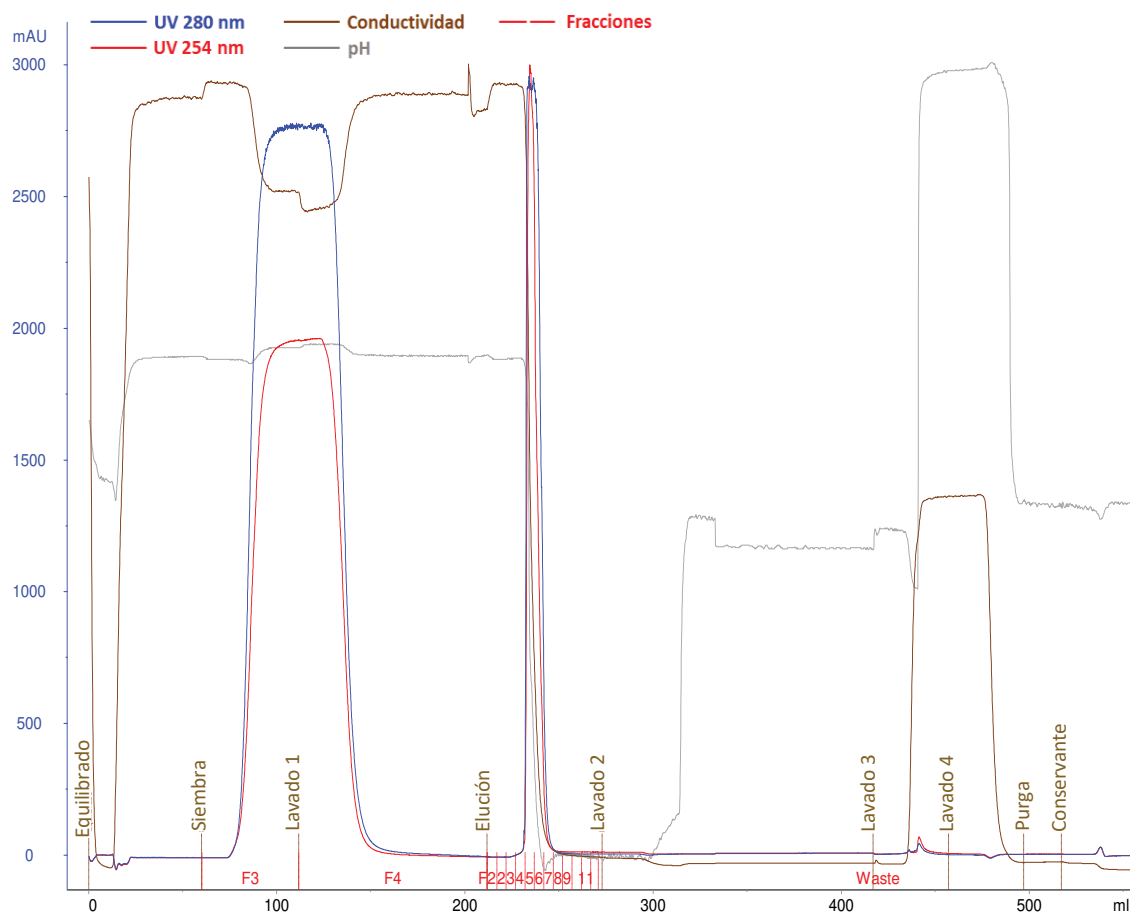
La purificación de las variantes de GMOP-IFN a partir de los sobrenadantes de cultivo de las líneas celulares CHO-K1 recombinantes se llevó a cabo por medio de la técnica de cromatografía de inmunoadfinidad. Dada su elevada especificidad, esta técnica posibilitó la obtención de soluciones proteicas con alto grado de pureza en un único paso cromatográfico, con recuperaciones superiores al 80%. Para ello se empleó el mAb CA5E6 purificado a partir de ascitis murina y acoplado a una matriz de *Sepharose*<sup>®</sup>, según el protocolo descrito en la sección 8.2 de *Materiales y Métodos*.

#### **3.1. Preparación de la matriz de inmunoadfinidad CA5E6-Sepharose: purificación del mAb anti-rhIFN- $\alpha$ 2b CA5E6 y acoplamiento a la matriz de Sepharose**

El mAb CA5E6, desarrollado en el laboratorio en conjunto con una serie de mAbs anti-rhIFN- $\alpha$ 2b [161], es capaz de reconocer tanto a la variante no glicosilada del IFN (empleada para su generación) como también a diversas variantes con diferente grado de glicosilación [42,162], incluidas las variantes fusionadas al péptido GMOP. Por esta razón, dicho anticuerpo fue empleado para la cuantificación y purificación de todas sus variantes de-inmunizadas.

La purificación del mAb CA5E6 a partir de líquido ascítico se realizó mediante cromatografía de afinidad a proteína A. En la Figura 17 se presenta el cromatograma de la purificación obtenido utilizando una columna XK 16/20 conteniendo 20 ml de resina, en un cromatógrafo *ÄKTA Purifier*. Se obtuvo un pico de elución en las fracciones 4 a 8, las cuales fueron colectadas y conservadas a -20°C para su posterior diálisis contra PBS o solución de acoplamiento, según fuera necesario.

Se prepararon 12 ml de resina para emplear en la purificación de las diferentes variantes de GMOP-IFN. Teniendo en cuenta que el fabricante recomienda inmovilizar aproximadamente 5 mg de mAb por cada ml de resina, se emplearon 59,2 mg de anticuerpo, obteniéndose un rendimiento de acoplamiento del 90,8%. La capacidad teórica de la resina se calculó según la ecuación 6 de la sección 8.2.3 del apartado *Materiales y Métodos*, teniendo en cuenta la masa de anticuerpo efectivamente inmovilizado (53,8 mg) y considerando que cada molécula de mAb (150 kDa) es capaz de ligar, por lo menos, a una molécula de rhIFN- $\alpha$ 2b no glicosilado (19 kDa). Por lo tanto 53,8 mg de anticuerpo (0,36  $\mu$ mol) serían capaces de unir a 0,36  $\mu$ mol de rhIFN- $\alpha$ 2b no glicosilado, lo cual permitió asumir una capacidad teórica de la resina de por lo menos 6,8 mg de rhIFN- $\alpha$ 2b no glicosilado, esto es 0,56 mg de rhIFN- $\alpha$ 2b por ml de resina.

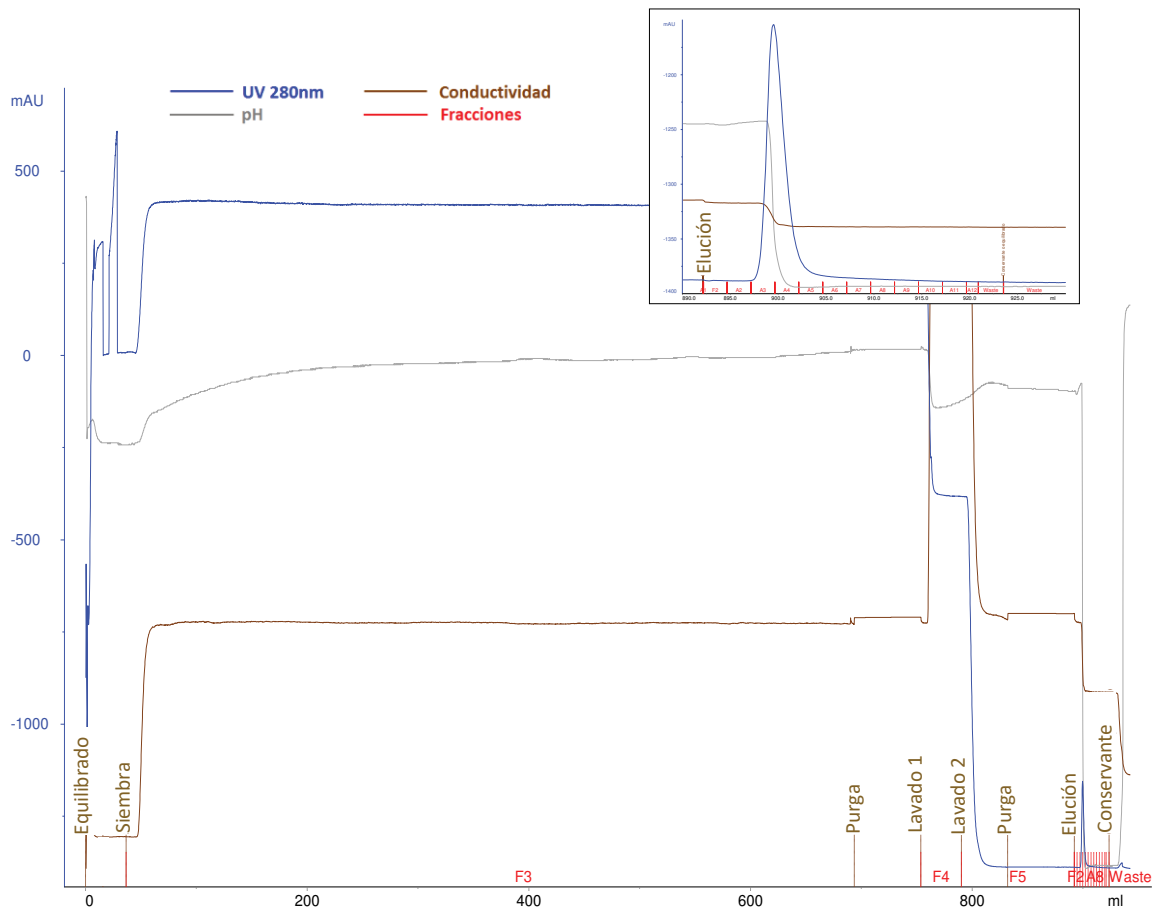


**Figura 17.** Purificación del mAb CA5E6 a partir de ascitis murina mediante cromatografía de inmunoafinidad a proteína A. En el perfil cromatográfico se muestran los registros de absorbancia a 280 nm (azul), absorbancia a 254 nm (rojo), conductividad (marrón), pH (gris) y fracciones recolectadas ( $F_n$ , líneas verticales en rojo).

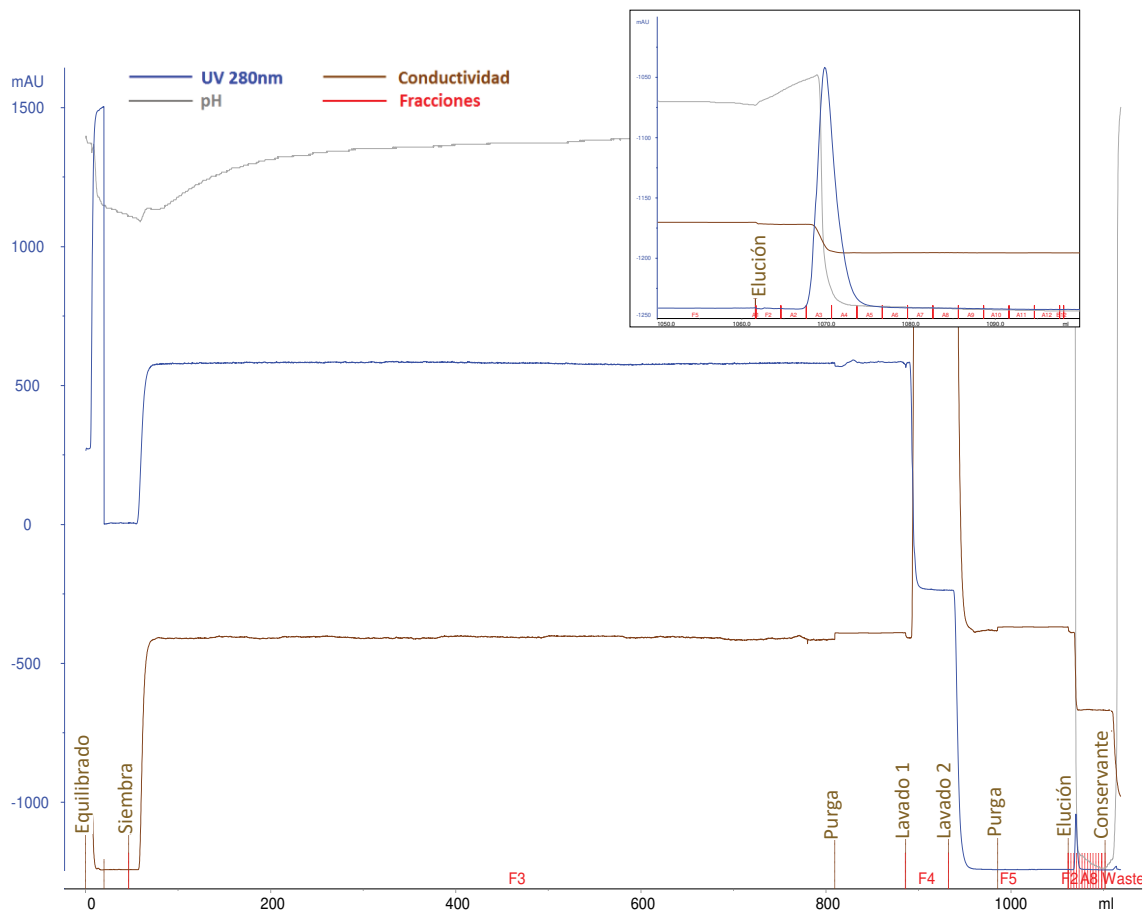
### 3.2. Cromatografía de inmunoafinidad empleando la resina CA5E6-Sepharose

La obtención de las diferentes moléculas de GMOP-IFN con elevado grado de pureza constituyó una etapa clave para su posterior caracterización, la cual involucró el análisis del grado de glicosilación, la evaluación de la actividad biológica antivital y antiproliferativa *in vitro*, la determinación de los parámetros farmacocinéticos y el análisis de la inmunogenicidad por medio de ensayos *ex vivo* e *in vivo*. Los procesos cromatográficos fueron realizados empleando la matriz CA5E6-Sepharose preparada previamente. El total de la resina preparada se dividió en dos lotes de entre 5 ml y 7 ml de matriz, cada uno de los cuales fue utilizado para la purificación de hasta dos de las muteínas, realizando sucesivos ciclos de sanitización entre la purificación de una variante y la siguiente. Se realizaron la cantidad de ciclos cromatográficos necesarios para purificar la totalidad del volumen de cada sobrenadante, teniendo en cuenta

la capacidad teórica de la resina y la concentración de proteína. En las Figura 18 y 19 se muestran, a modo de ejemplo, los cromatogramas correspondientes al primer proceso de purificación llevado a cabo para las proteínas de GMOP-IFN-VAR2 y GMOP-IFN-VAR3, respectivamente.



**Figura 18.** Purificación de GMOP-IFN-VAR2 mediante cromatografía de inmunoafinidad. Cromatograma correspondiente a la purificación de la molécula GMOP-IFN-VAR2 presente en el sobrenadante de cultivo de las cosechas obtenidas durante la etapa de producción. Se muestran los registros de absorbancia a 280 nm (azul), conductividad (marrón), pH (gris) y fracciones recolectada ( $F_n$ , líneas verticales en rojo). En la esquina superior derecha se muestra una ampliación del pico de elución.



**Figura 19.** Purificación de GMOP-IFN-VAR3 mediante cromatografía de inmunoafinidad. Cromatograma correspondiente a la purificación de la molécula GMOP-IFN-VAR3 presente en el sobrenadante de cultivo de las cosechas obtenidas durante la etapa de producción. Se muestran los registros de absorbancia a 280 nm (azul), conductividad (marrón), pH (gris) y fracciones recolectada ( $F_n$ , líneas verticales en rojo). En la esquina superior derecha se muestra una ampliación del pico de elución.

Para evaluar el rendimiento de los procesos de purificación, se tomaron muestras representativas de las distintas etapas de todas las cromatografías (siembra, *flowthrough*, lavados y fracciones de elución) y se determinó la concentración de IFN presente en las mismas mediante ELISA sándwich. Los datos obtenidos permitieron calcular el porcentaje de recuperación, el cual fue superior al 80% en todos los casos. En la Tabla 4 se muestran los cálculos correspondientes a las purificaciones representadas en las Figura 18 y 19.

**Tabla 4.** Cálculo de la recuperación (R) de las purificaciones de GMOP-IFN-VAR2 y GMOP-IFN-VAR3 mediante cromatografía de inmovilización de afinidad.

<b>GMOP-IFN-VAR2</b>				
<b>Muestra</b>	<b>Volumen (ml)</b>	<b>Concentración (µg/ml)</b>	<b>Masa (µg)</b>	<b>Recuperación (%)</b>
<b>Siembra</b>	1300	1,0	1315	100
<b>FT</b>	1300	0,2	204	16
<b>E<sub>3</sub>-E<sub>4</sub></b>	6	166	995	76
<b>E<sub>5</sub></b>	3	37	112	8,5
<b>GMOP-IFN-VAR3</b>				
<b>Muestra</b>	<b>Volumen (ml)</b>	<b>Concentración (µg/ml)</b>	<b>Masa (µg)</b>	<b>Recuperación (%)</b>
<b>Siembra</b>	610	1,7	1026	100
<b>FT</b>	610	<i>No cuantificable</i>		
<b>E<sub>3</sub>-E<sub>4</sub>-E<sub>5</sub></b>	12,5	87	1087	106

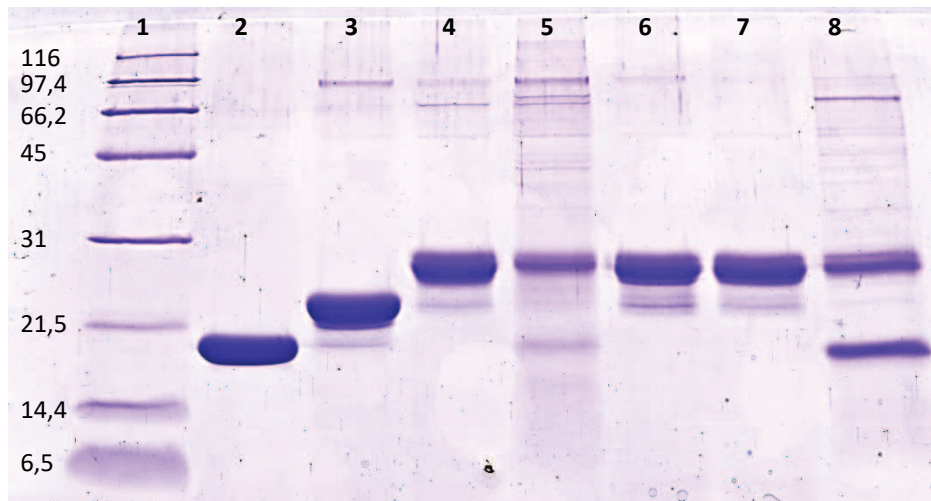
FT: Flowthrough; E<sub>n</sub>: Fracciones de elución neutralizadas con Tris-HCl 1M pH8.

A partir de los datos presentados en la Tabla 4 se observa que, si bien en el proceso de purificación de GMOP-IFN-VAR2 se llevó a cabo a un 45% aproximadamente por debajo de la capacidad teórica calculada (para 5 ml de resina la capacidad teórica sería de 2,8 mg de IFN), el 16% de la masa total de proteína sembrada no quedó retenida, encontrándose en la fracción correspondiente al *flowthrough*. Esto se debe a que la capacidad dinámica o experimental suele estar por debajo del valor teórico, pudiendo representar incluso sólo el 30% del mismo [163]. Por este motivo, para las siguientes purificaciones se decidió trabajar sembrando una masa total de IFN que no supere el 30% de la capacidad teórica calculada, evitando de esta forma pérdidas indeseadas.

Una vez finalizados todos los eventos de purificación para cada molécula, se mezclaron las fracciones de elución con mayor contenido proteico y se procedió a su concentración y diafiltración contra PBS. La concentración final de cada variante fue determinada mediante lectura espectrofotométrica a  $\lambda=280$ .

Posteriormente, se determinó el grado de pureza de las proteínas purificadas mediante SDS-PAGE, tinción con azul brillante de *Coomassie* (Figura 20) y densitometría.





**Figura 20.** Evaluación del perfil electroforético de las variantes de GMOP-IFN de-inmunizadas, purificadas a partir de sobrenadantes de cultivo. Las fracciones correspondientes a los picos de elución de cada purificación se mezclaron, diafiltraron y analizaron mediante la técnica de SDS-PAGE en condiciones reductoras, con posterior tinción con azul brillante de *Coomsie*. Calles: 1- Marcador de masa molecular; 2- IFN- $\alpha$ 2b no glicosilado; 3- IFN-WT; 4- GMOP-IFN; 5- GMOP-IFN-VAR1; 6- GMOP-IFN-VAR2; 7- GMOP-IFN-VAR3; 8- GMOP-IFN-VAR4.

Todas las variantes de GMOP-IFN exhibieron una banda principal con similar movilidad en el SDS-PAGE, con respecto a la proteína sin de-inmunizar. Sin embargo, los perfiles electroforéticos mostraron grandes diferencias entre sí. Se detectó una banda de menor peso molecular en las calles correspondientes a GMOP-IFN-VAR1 y GMOP-IFN-VAR4, la cual se corresponde con el tamaño molecular del IFN- $\alpha$ 2b no glicosilado. Este resultado señala la existencia de isoformas carentes de *O*-glicosilación en dichas proteínas. Por el contrario, GMOP-IFN-VAR2 y GMOP-IFN-VAR3 exhibieron perfiles migratorios similares al de GMOP-IFN, con masas moleculares aparentes promedio de 28 kDa, superiores a las obtenidas para IFN- $\alpha$ 2b sin glicosilar e IFN-WT (cuyas masas moleculares aparentes promedio son de 21 kDa y 25 kDa, respectivamente). El incremento en la masa molecular de las citoquinas confirma la incorporación exitosa de *O*-glicosilaciones dentro de la etiqueta peptídica GMOP, cuya masa molecular teórica, considerando sólo la secuencia aminoacídica, es de aproximadamente 1,5 kDa. Asimismo, los niveles de pureza obtenidos para estas dos variantes fueron similares a los alcanzados para GMOP-IFN (superiores al 94%). En contraste, los niveles de pureza de las variantes GMOP-IFN-VAR1 y GMOP-IFN-VAR4 fueron muy inferiores, con valores cercanos al 80%.

Estos resultados concuerdan con la información obtenida a partir del análisis de sitios de glicosilación de tipo mucina, empleando el software provisto por el servidor *ISOGlyP*, el cual permitió predecir la presencia de cinco sitios de *O*-glicosilación para las moléculas GMOP-IFN,

GMOP-IFN-VAR2 y GMOP-IFN-VAR3 y seis sitios para las restantes variantes de-inmunizadas, GMOP-IFN-VAR1 y GMOP-IFN-VAR4.

El algoritmo *ISOGlyP* permite identificar sitios probables de adición de *O*-glicanos, teniendo en cuenta la especificidad de isoformas de las distintas GalNAc-Ts. Por medio de la asignación de valores de EVP basados en la preferencia de aminoácidos que presentan los dominios catalíticos de las diferentes GalNAc-Ts, el algoritmo predice cuán propenso es un determinado residuo de Ser/Thr de ser glicosilado por una transferasa específica, con asertividad del 70% en la predicción. Considerando los valores de EVP obtenidos para las transferasas GalNAcT11, GalNAcT2 y GalNAcT3, de expresión comprobada en células CHO-K1 [164], la inserción de *O*-glicanos tendría lugar en las posiciones Ser 5, 7 y 9 y Thr 10 y 120 de todas las variantes. Uno de estos sitios (Thr120) corresponde al residuo Thr106 naturalmente glicosilado en el hIFN- $\alpha$ 2b nativo, por lo que, de acuerdo con estos resultados, la etiqueta peptídica GMOP aportaría 4 sitios de *O*-glicosilación. Por otra parte, para las proteínas GMOP-IFN-VAR1 y GMOP-IFN-VAR4 se predijo un sitio adicional de *O*-glicosilación en la Thr83, que forma parte de la secuencia del hIFN- $\alpha$ 2b y que naturalmente no se encuentra glicosilado. Es interesante observar que estas proteínas presentan las modificaciones N79A y L80A, las cuales podrían generar un entorno más favorable para la adición de *O*-glicanos en la Thr83, modificando la preferencia de las transferasas por este residuo.

En la Tabla 5 se detallan las posiciones aminoacídicas que presentan elevada probabilidad de *O*-glicosilación según la herramienta predictiva *ISOGlyP*, las cuales corresponden a la proteína madura, es decir, una vez que el péptido señal ha sido clivado.

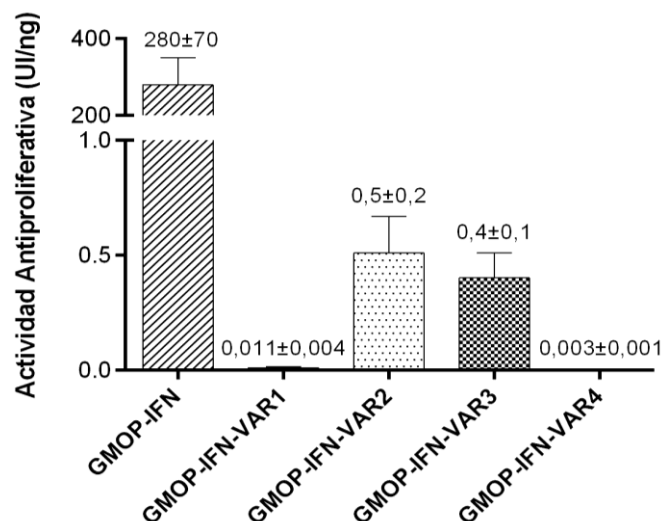
**Tabla 5.** Predicción de los sitios susceptibles de *O*-glicosilación en GMOP-IFN y sus variantes de-inmunizadas, mediante el uso del servidor *ISOGlyP*.

<b>Predicción para las proteínas</b>	<b>S/T</b>	<b>Posición</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Transferasa</b>		
				<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T11</b>
GMOP-IFN y todas sus variantes de-inmunizadas	S	5	-APARSPSPST	1.35	0.66	8.38
	S	7	PARSPSPSTQP	1.40	0.25	4.45
	S	9	RSPSPSTQPWE	4.20	0.21	4.15
	T	10	SPSPSTQPWEC	1.92	0.89	2.42
	T	120	QGVGVTTETPLM	6.50	6.61	7.23
GMOP-IFN-VAR1 y GMOP-IFN-VAR4	T	83	FAAFSTKDSSA	0.94	0.41	1.19

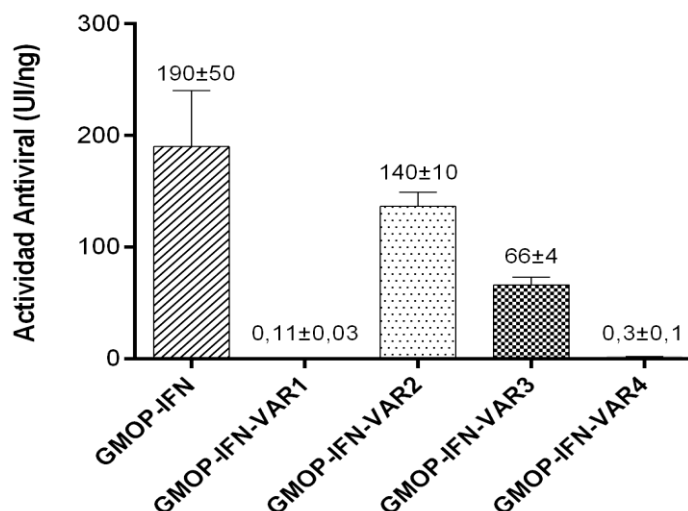
#### 4. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL Y ANALÍTICA DE LAS VARIANTES DE-INMUNIZADAS DE GMOP-IFN

##### 4.1. Valoración de la actividad biológica *in vitro* de las variantes de GMOP-IFN

La estrategia de de-inmunización empleada en este trabajo consistió en la modificación de aquellos aminoácidos inmunogénicos en la secuencia de GMOP-IFN, sin generar alteraciones en los residuos directamente involucrados en la unión al receptor. El impacto de estas mutaciones sobre la función endógena de las proteínas de-inmunizadas fue evaluado por medio de la determinación de la capacidad de cada molécula para ejercer su actividad biológica *in vitro*. Por un lado, se analizó la actividad antiproliferativa, evaluando la influencia de estas moléculas sobre la viabilidad y la proliferación de la línea celular Daudi. Además, se analizó su actividad antiviral *in vitro*, por medio de la determinación de su capacidad para ejercer efectos inhibitorios sobre la propagación de un virus lítico, y por lo tanto de proteger a células susceptibles del efecto citopático del mismo. Existe una gran variedad de sistemas línea celular/virus; en el presente trabajo se utilizó el sistema que emplea la línea celular MDBK junto al virus de la estomatitis vesicular (VSV). A partir de estas determinaciones se calculó la ABE, realizando el cociente entre la actividad volumétrica y la concentración de cada proteína (Figura 21 y 22).



**Figura 21.** Valoración de la actividad biológica antiproliferativa de las versiones de-inmunizadas de GMOP-IFN. La cuantificación de la actividad específica de cada molécula fue determinada a partir de la comparación con un estándar internacional (NIBSC). El gráfico muestra el promedio de los resultados obtenidos en cinco ensayos independientes  $\pm$  DS.



**Figura 22.** Valoración de la actividad biológica antiviral de las versiones de-inmunizadas de GMOP-IFN. La cuantificación de la actividad específica de cada molécula fue determinada a partir de la comparación con un estándar internacional (NIBSC). El gráfico muestra el promedio de los resultados obtenidos en cinco ensayos independientes  $\pm$  DS.

Además, se calculó el valor de la actividad biológica antiviral porcentual, realizando el cociente entre la ABE de GMOP-IFN ( $190 \pm 50$  UI/ng) y la correspondiente ABE de cada una de las variantes de GMOP-IFN (Tabla 6).

**Tabla 6.** Ensayo comparativo de la actividad biológica antiviral de las variantes de-inmunizadas de GMOP-IFN.

<i>Proteína</i>	<i>Actividad antiviral específica relativa (%)</i>
<b>GMOP-IFN-VAR1</b>	$0,06 \pm 0,02$
<b>GMOP-IFN-VAR2</b>	$72 \pm 4$
<b>GMOP-IFN-VAR3</b>	$35 \pm 2$
<b>GMOP-IFN-VAR4</b>	$0,17 \pm 0,05$

A partir del análisis de estos resultados se observa una marcada reducción en la actividad antiproliferativa específica de las cuatro variantes de GMOP-IFN con respecto a la citoquina sin de-inmunizar.

Por otro lado, las proteínas GMOP-IFN-VAR2 y GMOP-IFN-VAR3 conservaron una elevada proporción de la actividad antiviral específica original (72% y 35%, respectivamente). Estos resultados sugieren que las modificaciones introducidas en GMOP-IFN-VAR2 podrían haber causado una leve disrupción estructural en la citoquina, pero sin impedir su unión al

receptor en la superficie de las células MDBK. Naturalmente, es probable que el mayor número de mutaciones incluidas en la secuencia de GMOP-IFN-VAR3 generen modificaciones estructurales que redujeron su capacidad de unión al receptor, lográndose no obstante cierto grado de protección del cultivo frente a la infección viral. Por otro lado, para las proteínas GMOP-IFN-VAR1 y GMOP-IFN-VAR4 los porcentajes de actividad antiviral residual fueron de 0,06% y 0,17%, respectivamente. Esta caída abrupta en los valores de actividad, sumado a la escasa masa recuperada de cada una de ellas y los bajos porcentajes de pureza obtenidos, evidenciados en la corrida electroforética (Figura 20), motivó la exclusión de estas dos proteínas de los estudios posteriores.

Teniendo en cuenta estos resultados en conjunto y dado que tanto la actividad antiviral como la antiproliferativa del IFN involucran al mismo receptor celular, se puede inferir que la actividad antiproliferativa del mismo presenta mayor susceptibilidad que la actividad antiviral a modificaciones en la secuencia aminoacídica.

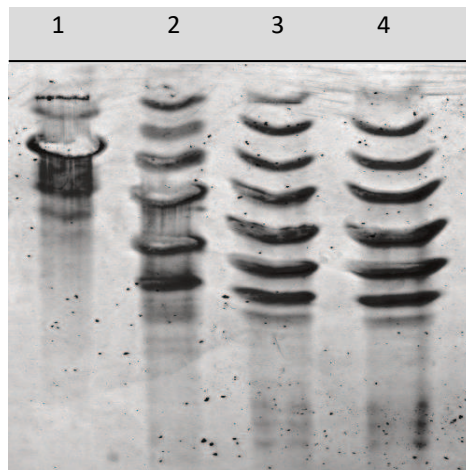
#### **4.2. Análisis del perfil de glicoformas de las variantes de-inmunizadas de GMOP-IFN por medio de IEF**

Si bien cada proteína presenta una secuencia primaria única, dentro de las diferentes muestras existe una “población” de proteínas que difieren en el patrón de glicosilación (glicoformas o isoformas). La diferencia principal entre ellas está dada por el contenido de ácido siálico, que le confiere a cada molécula una carga eléctrica particular. Mediante focalización isoelectrica se realizó la caracterización de la heterogeneidad del contenido de glicoformas de las variantes de-inmunizadas funcionales, esto es GMOP-IFN-VAR2 y GMOP-IFN-VAR3, incluyendo además a las proteínas GMOP-IFN e IFN-WT. Esta técnica permitió separar las isoformas de las moléculas de acuerdo a su carga eléctrica, por medio del desplazamiento a través de un gradiente de pH y como consecuencia de la aplicación de una diferencia de potencial. La detección de las bandas se realizó mediante tinción con el colorante *Coomasie blue* coloidal (Figura 23).

En la calle correspondiente al IFN-WT se detectaron 4 bandas, debido a la presencia de distintas estructuras glicosiladas unidas al residuo Thr106 mediante enlace de tipo *O*-, las cuales contienen diferente grado de sialilación, en concordancia con resultados previamente publicados [165]. De forma comparativa, en la calle correspondiente a GMOP-IFN el mayor contenido de estructuras glicosídicas, evidenciado por la presencia de aproximadamente 7 isoformas situadas en la región más ácida del gel, confirma la presencia de diversas estructuras glicosídicas unidas a la etiqueta peptídica GMOP. Estas cadenas de polisacáridos aportan

mayor número de residuos de ácido siálico a la proteína, causando una disminución del punto isoeléctrico con respecto a la citoquina nativa.

Además, se puede observar que ambas variantes de-inmunizadas desarrollaron un perfil electroforético similar, con un total de 8 bandas localizadas en la región más ácida del gel, lo cual señala que estas muteínas presentan mayor contenido de ácido siálico que su contraparte no de-inmunizada. Más aún, se puede apreciar que la banda correspondiente a la isoforma menos ácida de GMOP-IFN-VAR3 (esquina superior derecha) es comparativamente más tenue, en relación a la intensidad de esa misma banda en el perfil de GMOP-IFN-VAR2. Esta diferencia sugiere que el mayor porcentaje de actividad biológica específica *in vitro* determinado para GMOP-IFN-VAR2 podría asociarse a la composición y distribución de sus isoformas (mayor contenido relativo de isoformas menos ácidas), capaces de interactuar con el receptor de IFN cargado negativamente.

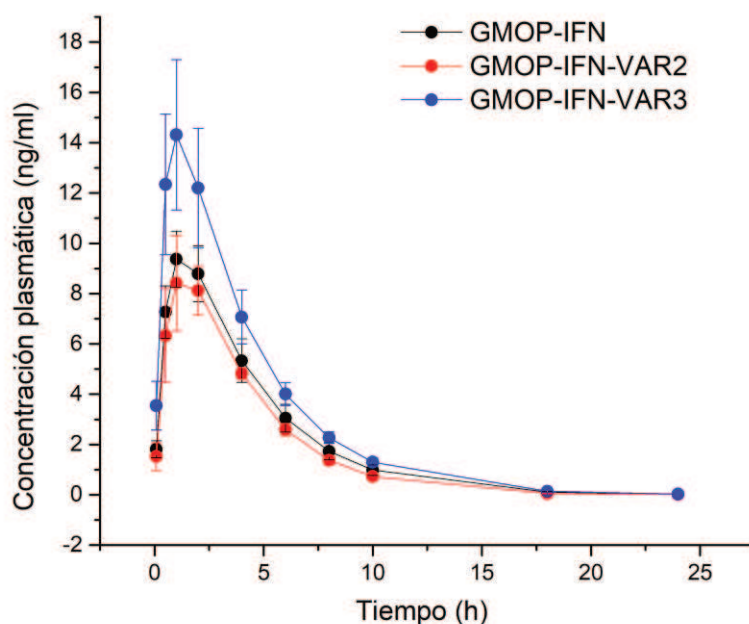


**Figura 23.** Análisis del perfil de glicofomas de las variantes de hIFN- $\alpha$ 2b. Mediante focalización isoeléctrica se evaluó el patrón de isoformas con diferente grado de glicosilación que presenta cada variante del hIFN- $\alpha$ 2b. Calles: 1- IFN-WT; 2- GMOP-IFN; 3- GMOP-IFN-VAR2; 4- GMOP-IFN-VAR3.

##### **5. EVALUACIÓN DEL PERFIL FARMACOCINÉTICO DE LAS VARIANTES GMOP-IFN-VAR2 y GMOP-IFN-VAR3.**

Con el objetivo de evaluar el efecto que ejercen las modificaciones introducidas en la secuencia del GMOP-IFN en las propiedades *in vivo* de la citoquina, se realizó la caracterización de los perfiles farmacocinéticos de sus variantes de-inmunizadas, GMOP-IFN-VAR2 y GMOP-IFN-VAR3, comparándolos con los parámetros de la molécula sin de-inmunizar. El ensayo se realizó mediante inyección subcutánea de una única dosis de las diferentes moléculas en ratas Wistar hembra. Se inoculó la misma dosis de todas las variantes, en unidades de masa,

mientras que su cuantificación en las muestras de plasma correspondientes a los distintos tiempos posinyección se realizó mediante valoración de la AB antiviral *in vitro*. Esto se debe a que el bajo límite de detección dicha técnica brinda la posibilidad de cuantificar las proteínas de interés aun cuando los niveles en plasma son muy reducidos. Con estos datos, y conociendo la ABE de cada molécula, se graficó la masa de proteína remanente en función del tiempo transcurrido desde la inoculación de la proteína (Figura 24).



**Figura 24.** Perfil farmacocinético de las variantes de-inmunizadas de GMOP-IFN, evaluados en animales de experimentación luego de su inyección subcutánea. Se graficó la concentración de las variantes GMOP-IFN (●), GMOP-IFN-VAR2 (●) y GMOP-IFN-VAR3 (●) en función del tiempo transcurrido desde la inyección. Los resultados para cada tiempo se muestran como el promedio  $\pm$  DS (n=4).

Las curvas obtenidas se analizaron aplicando un modelo de un compartimento, asumiendo cinéticas absorción y eliminación de primer orden, para el cálculo de los parámetros: concentración plasmática máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ), tiempo necesario para alcanzarla ( $T_{m\acute{a}x}$ ), tiempo de vida media terminal ( $t_{1/2elim}$ ), que hace referencia al tiempo transcurrido hasta que la concentración plasmática de la droga se reduce a la mitad; y *clearance* plasmático aparente ( $Cl_{app}$ ), como una medida de la velocidad de depuración del fármaco que no tiene en cuenta la biodisponibilidad de la droga en el organismo (Tabla 7). Las diferencias entre los tratamientos ensayados fueron evaluadas mediante la aplicación del método ANOVA, con posterior test de Tukey, considerando la existencia de diferencias significativas entre muestras cuando  $p \leq 0,05$ .

**Tabla 7.** Parámetros farmacocinéticos de GMOP-IFN y sus variantes de-inmunizadas, luego de la inyección subcutánea en ratas.

Proteína	Parámetro			
	T <sub>max</sub> (h)	C <sub>máx</sub> (ng/ml)	t <sub>1/2elim</sub> (h)	Cl <sub>app</sub> (ml/h)
GMOP-IFN	1,3 ± 0,2	10 ± 1	2,4 ± 0,1	124 ± 18
GMOP-IFN-VAR2	1,4 ± 0,3	9 ± 2	2,2 ± 0,1	116 ± 10
GMOP-IFN-VAR3	1,0 ± 0,2	14 ± 3	2,5 ± 0,3	73 ± 9 *

De la Tabla 7 se puede observar que las tres moléculas presentaron un comportamiento similar durante la fase de absorción, exhibiendo valores de T<sub>máx</sub> semejantes, por encima del valor de T<sub>máx</sub> registrado en estudios anteriores tanto para el IFN-WT (0,78 ± 0,12 h), como para la citoquina comercial sin glicosilar (0,52 ± 0,07 h) [42], sin mostrar diferencias significativas entre ellos. Esto indica que la fase inicial de distribución de las variantes evaluadas sería similar.

En cuanto a la fase de eliminación, no se registraron diferencias en los valores de t<sub>1/2elim</sub> entre las proteínas estudiadas, siendo a la vez todos ellos muy superiores a los descriptos para el IFN-WT (1,38 ± 0,33 h) o la versión comercial no glicosilada (0,64 ± 0,12) [42]. Sin embargo, al analizar las velocidades de depuración plasmática, es posible observar una reducción significativa (de aproximadamente 2 veces) en el valor de Cl<sub>app</sub> obtenido para GMOP-IFN-VAR3 (73 ± 9 ml/h) con respecto a los correspondientes a GMOP-IFN y GMOP-IFN-VAR2 (124 ± 18 ml/h y 116 ± 10 ml/h, respectivamente).

Estos resultados demuestran que las propiedades farmacocinéticas mejoradas que se obtienen como consecuencia de la adición de la etiqueta peptídica rica en hidratos de carbono a la molécula de IFN-WT se mantienen en las variantes de-inmunizadas, incluso con una mejora adicional en GMOP-IFN-VAR3 desde el punto de vista del Cl<sub>app</sub>.

## 6. EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD EX VIVO DE GMOP-IFN Y SUS VERSIONES DE-INMUNIZADAS

Debido a la asociación directa entre la presencia de epitopes para células T en una proteína terapéutica y el título y longevidad de ADAs desarrollados contra la misma, se han descrito diversos métodos que permiten analizar la activación antígeno-específica de linfocitos T y consecuentemente determinar el potencial de inducción de la respuesta inmune de un terapéutico. Uno de los ensayos pre-clínicos más empleados consiste en evaluar mediante metodologías *ex vivo* la respuesta que desarrollan células del sistema inmunológico como consecuencia de su exposición a un dado terapéutico. La respuesta inmune resultante



de dicha exposición se puede evaluar por medio de la cuantificación de las citoquinas IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-17, TNF- $\alpha$ , entre otras, producidas por los linfocitos T colaboradores activados.

### 6.1. Tipificación de los alelos HLA-DRB1 en muestras de sangre

Los ensayos de evaluación de la inmunogenicidad *ex vivo* han sido ampliamente utilizados en la evaluación del riesgo asociado a la terapia con bioterapéuticos [71,76,77]. En la actualidad se conoce que su confiabilidad y robustez dependen en gran medida del grado de heterogeneidad del genotipo HLA-DRB1 de la población analizada [121]. En este trabajo, las muestras de sangre fueron obtenidas a partir de 25 donantes sanos, con edades comprendidas en un rango entre 18 y 60 años. En la Tabla 8 se presentan los alelos HLA-DRB1 expresados por los donantes en estudio.

**Tabla 8.** Tipificación de los alelos HLA-DRB1 expresados por los donantes que conforman la cohorte en estudio, por medio de la tecnología de secuenciación *Luminex*.

<i>Donante</i>	<i>Alelo</i>	
	<b>DRB1_1</b>	<b>DRB1_2</b>
<b>1</b>	DRB1*01	DRB1*04
<b>2</b>	DRB1*15	DRB1*15
<b>3</b>	DRB1*04	DRB1*13
<b>4</b>	DRB1*03	DRB1*04
<b>6</b>	DRB1*03	DRB1*08
<b>7</b>	DRB1*01	DRB1*03
<b>8</b>	DRB1*09	DRB1*11
<b>9</b>	DRB1*11	DRB1*16
<b>10</b>	DRB1*07	DRB1*13
<b>12</b>	DRB1*03	DRB1*08
<b>13</b>	DRB1*07	DRB1*11
<b>14</b>	DRB1*01	DRB1*13
<b>16</b>	DRB1*11	DRB1*15
<b>17</b>	DRB1*01	DRB1*16
<b>18</b>	DRB1*04	DRB1*15
<b>19</b>	DRB1*11	DRB1*15
<b>22</b>	DRB1*01	DRB1*03
<b>23</b>	DRB1*04	DRB1*13
<b>24</b>	DRB1*07	DRB1*11
<b>25</b>	DRB1*13	DRB1*16

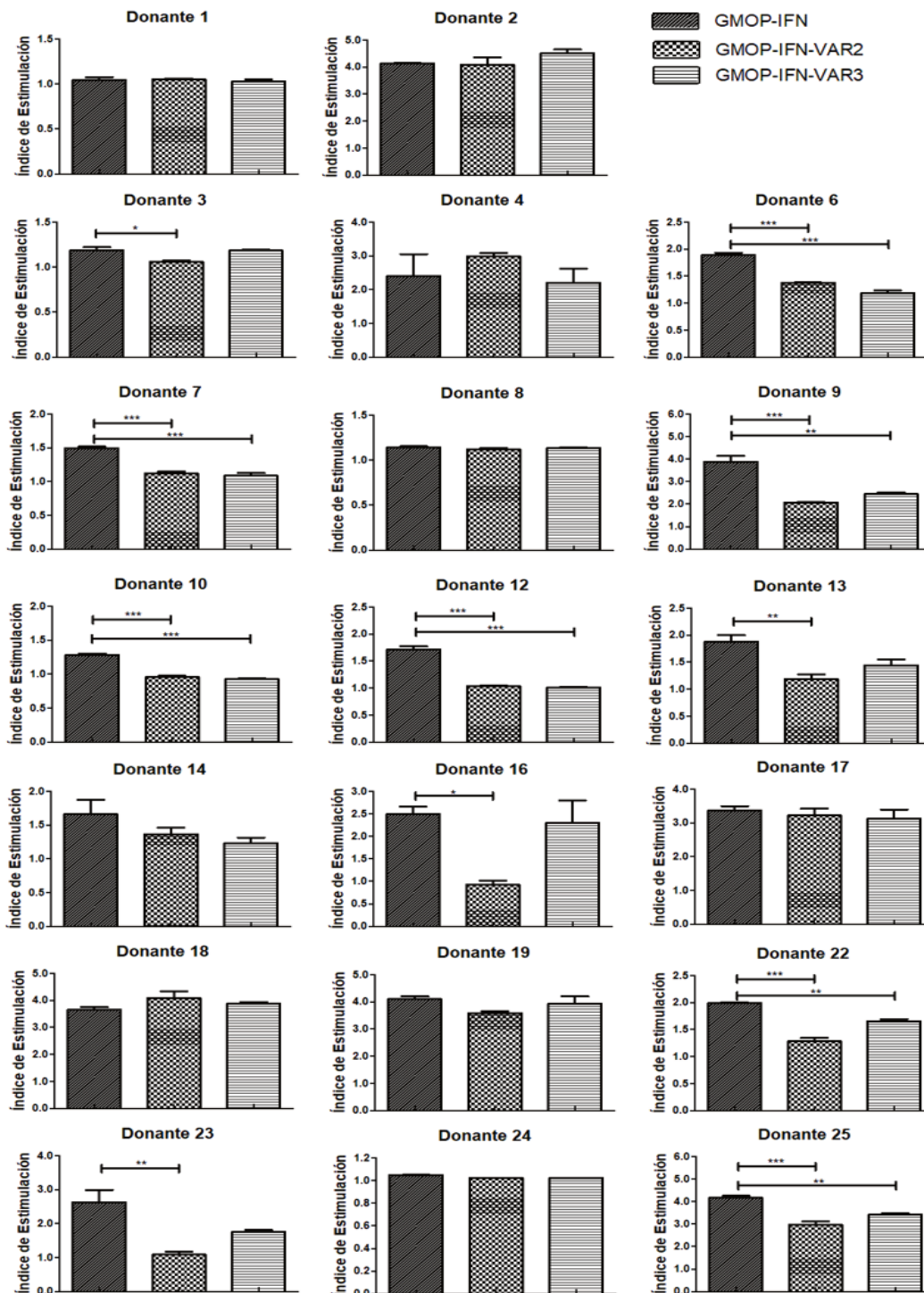
Los resultados reflejan una gran diversidad en la composición alélica de los donantes que integran la población analizada, estando incluidos todos los alelos de mayor prevalencia en la población mundial (información adquirida de [www.allelefreqencies.net](http://www.allelefreqencies.net)). Al compararlos con la frecuencia de estos haplotipos en la población mundial, se observó una buena correlación entre ambos conjuntos de datos (superior al 80%). Por lo tanto, con la mayoría de estas muestras se procedió a realizar los ensayos de activación linfocitaria que se detallan a continuación.

### **6.2. Evaluación de la activación de linfocitos T-CD4<sup>+</sup> a partir de su incubación con las distintas variantes de GMOP-IFN**

Teniendo en cuenta que la proliferación de los linfocitos T-CD4<sup>+</sup> en cultivo podría verse afectada por la actividad antiproliferativa de las diferentes variantes de GMOP-IFN, para el desarrollo de los ensayos de linfoactivación se llevó a cabo un protocolo alternativo, que involucró una etapa inicial de generación de células dendríticas a partir de monocitos. El paso siguiente consistió en incubar estas células dendríticas inmaduras con las diferentes proteínas en estudio, durante un corto lapso de tiempo y a una concentración elevada, con el objetivo de favorecer la endocitosis y el procesamiento del antígeno. Posteriormente, se realizó un lavado con medio fresco y se indujo su maduración por medio de la incubación con hTNF- $\alpha$ , proceso a partir del cual los péptidos derivados del procesamiento del IFN son presentados en la superficie de las células dendríticas, unidos a las moléculas del CMH-II, y quedan disponibles para su interacción con los linfocitos T-CD4<sup>+</sup> que sean capaces de reconocerlos. Seguidamente, se realizó la co-incubación de estas células dendríticas maduras con linfocitos autólogos, incluyendo además como control positivo linfocitos autólogos estimulados con lectinas como agente mitógeno inespecífico.

Luego de 72h se colectaron los sobrenadantes de cultivo y se evaluaron las concentraciones de hIFN- $\gamma$  y hIL-4 mediante ELISA sándwich. A excepción de las muestras estimuladas con lectinas como agente mitógeno (control positivo) no fue posible detectar hIL-4 en los sobrenadantes de cultivo evaluados. Dada la acción mutuamente antagónica que ejercen ambas citoquinas [166], esto no resulta sorprendente, y es posible suponer que la respuesta polarizada hacia un perfil de tipo Th1, inhibió la producción de hIL-4 por parte de los linfocitos T activados, favoreciendo a la vez la secreción de hIFN- $\gamma$ . Por tal motivo, el análisis de la inmunogenicidad *ex vivo* se vio restringido al estudio de la producción de hIFN- $\gamma$  como indicador de la activación linfocitaria. La concentración de esta citoquina en los sobrenadantes de cultivo de las muestras incubadas con las diferentes variantes de GMOP-IFN se comparó

con la correspondiente concentración en los controles negativos (células cultivadas en las mismas condiciones, estimuladas con PBS).

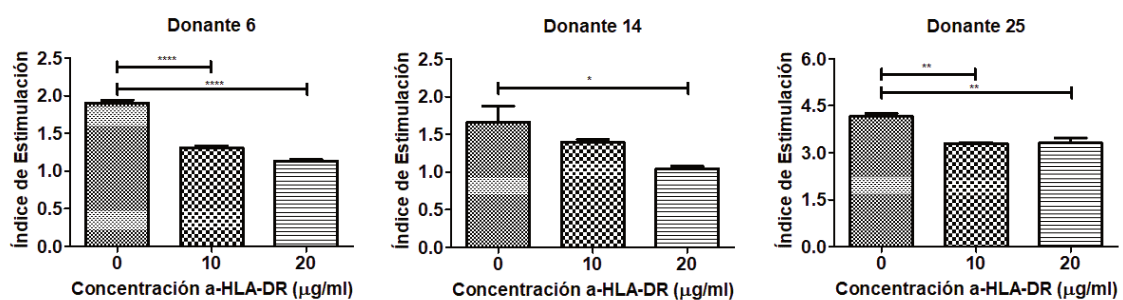


**Figura 25.** Análisis comparativo *ex vivo* de la inmunogenicidad de GMOP-IFN- $\alpha$ 2b y sus variantes de-inmunizadas. Se cuantificó la concentración de hIFN- $\gamma$  secretado al medio de cultivo como consecuencia de la activación linfocitaria, lo cual permitió verificar la reducción en la inmunogenicidad de las variantes GMOP-IFN-VAR2 y GMOP-IFN-VAR3 en comparación con la proteína original. Se graficaron los IE obtenidos a partir del cociente entre la concentración de hIFN- $\gamma$  en cada una de las muestras (GMOP-IFN, GMOP-IFN-VAR2 y GMOP-IFN-VAR3) y la concentración en las muestras control. Las diferencias entre los tratamientos ( $p < 0,05$ ) se evaluaron mediante ANOVA con posterior test de Tukey.

Los datos presentados en la Figura 25 muestran los valores promedio de IE, calculados a partir del cociente entre los niveles de hIFN- $\gamma$  en la muestra y en el control negativo, para cada donante. A partir de esto, se calculó el porcentaje de donantes que exhibieron menores IE al estimularlos con cada variante de-inmunizada, con respecto al GMOP-IFN, considerando diferencias significativas entre muestras cuando  $p \leq 0,05$ .

Los linfocitos T provenientes de la mayoría de las muestras respondieron a la estimulación con GMOP-IFN. Este resultado se correlaciona muy bien con las predicciones realizadas previamente con el *software* inmunoinformático provisto por *EpiMatrix*. También consistente con ello es la reducción de la inmunogenicidad *ex vivo* observada para ambas variantes de-inmunizadas, evidenciado por una reducción en las respuestas de hIFN- $\gamma$  en el 55% de los donantes para el caso de la proteína GMOP-IFN-VAR2 y en un 35% para el caso de la variante GMOP-IFN-VAR3.

Para completar este análisis, las células dendríticas provenientes de tres donantes, cuyas muestras resultaron activadas por GMOP-IFN, fueron tratadas con dicha proteína y posteriormente con un anticuerpo anti-HLA-DR. Luego, dichas células dendríticas se incubaron con los linfocitos autólogos correspondientes. Se observó una reducción en la activación de los linfocitos T-CD4<sup>+</sup> al incubar las células dendríticas con el anticuerpo anti-HLA-DR (Figura 26). Este efecto resultó aún más evidente al aumentar la concentración del anticuerpo. Esto demuestra el papel esencial que juegan las moléculas del HLA-DR en la presentación antigénica de los péptidos derivados del procesamiento antigénico de las diferentes variantes de GMOP-IFN y, por consiguiente, en la activación de los linfocitos T-CD4<sup>+</sup>.



**Figura 26.** Presentación antigénica de péptidos derivados de GMOP-IFN en el contexto de las moléculas HLA-DR. Se evaluó la restricción de las moléculas HLA a partir del bloqueo específico de las moléculas HLA-DR expuestas en la superficie de las células dendríticas maduras. Se puede observar una disminución sucesiva en los IE al incubar con concentraciones crecientes del anticuerpo anti-HLA-DR. Los IE fueron normalizados con respecto a la muestra control negativo (PBS).

## **7. EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE IN VIVO DE GMOP-IFN Y DE SUS VERSIONES DE-INMUNIZADAS**

La ocurrencia de una respuesta inmune de tipo T dependiente frente a la administración de un bioterapéutico en un paciente involucra la producción de anticuerpos de isotipo IgG que han atravesado un proceso de maduración de la afinidad, así como la generación de células B de larga vida y células plasmáticas, capaces de sostener la producción de elevados títulos de anticuerpos durante períodos prolongados. En numerosos casos estos anticuerpos presentan la capacidad de neutralizar la actividad biológica del terapéutico [52,167,168]. Por este motivo, la evaluación de la respuesta humoral *in vivo* contra las proteínas en estudio resulta de vital importancia.

En este sentido, teniendo en cuenta que las interacciones entre los complejos péptido-molécula del CMH-II y los TCR de los linfocitos T-CD4<sup>+</sup> son determinantes tanto para la selección del repertorio de células T maduras como para el desarrollo de respuestas inmunes, para llevar adelante el estudio de la inmunogenicidad *in vivo* se empleó un modelo de ratones transgénicos para las moléculas del CMH-II. Esto posibilita la conformación de un entorno de mayor similitud con el sistema inmune humano que los correspondientes ratones *wild type*. El modelo murino elegido está constituido por ratones cuyo sistema de presentación antigénica endógeno (H2 de Clase I y II) se ha eliminado y sustituido por alelos que codifican para proteínas del CMH humano (específicamente HLA-A2.1 y HLA-DR1).

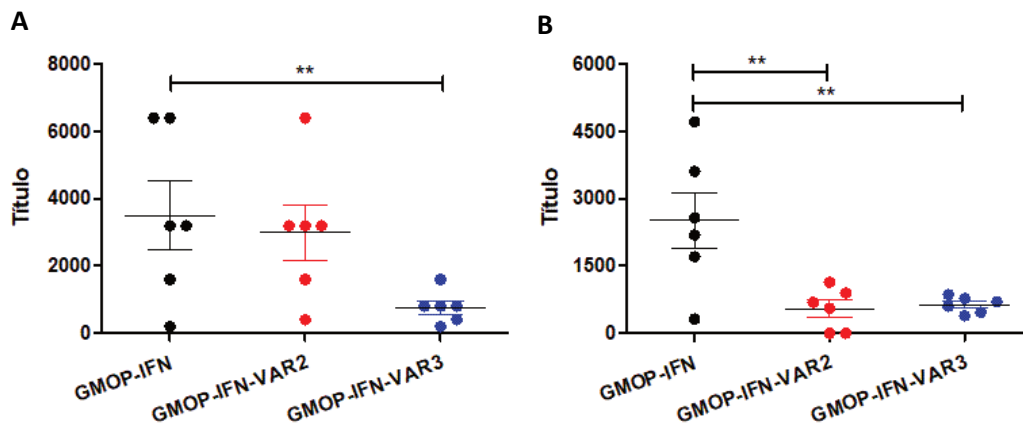
El protocolo de inmunización realizado (sección 12 del apartado *Materiales y Métodos*) consistió en tres inoculaciones intraperitoneales de las proteínas de interés, con empleo de adyuvante. Una vez finalizado, se tomaron muestras de sangre periférica y se realizó el sacrificio de todos los animales. Con estas muestras se realizaron ensayos de titulación de anticuerpos totales y neutralizantes mediante ELISA sándwich.

### **7.1. Evaluación del título de anticuerpos $\bar{\alpha}$ -rhIFN- $\alpha$ 2b en plasma de ratones inmunizados con las distintas versiones de GMOP-IFN**

Por medio de un ensayo de ELISA indirecto, se determinó la producción de anticuerpos específicos para las distintas variantes de GMOP-IFN en las muestras de plasma de ratones HLA-DR1 inmunizados. El cálculo del título de anticuerpos totales para cada uno de los animales se realizó a partir de las curvas de Absorbancia en función del logaritmo de la dilución (Figura 27-A). A partir del análisis de varianza (ANOVA) y posterior test de comparación múltiple de Tukey, considerando la existencia de diferencias significativas cuando  $p \leq 0,05$ , se obtuvo un título de anticuerpos totales en los ratones inmunizados con GMOP-IFN-VAR3 de

1:800  $\pm$  1:500, que resultó significativamente menor a los obtenidos para los grupos de ratones inmunizados con GMOP-IFN y GMOP-IFN-VAR2 (1:3500  $\pm$  1:2500 y 1:3000  $\pm$  1:2000 respectivamente).

Por otro lado, se realizó la titulación de anticuerpos neutralizantes de la actividad biológica antiviral de las distintas muteínas. En las muestras provenientes de ratones inmunizados con GMOP-IFN-VAR2 y GMOP-IFN-VAR3 se obtuvieron valores significativamente inferiores (1:600  $\pm$  1:500 y 1:600  $\pm$  1:200, respectivamente) en relación al valor promedio obtenido en las muestras de plasma provenientes de ratones tratados con GMOP-IFN (1:2500  $\pm$  1:1500; Figura 27-B). Esta determinación reviste una gran importancia, ya que la ocurrencia de títulos de anticuerpos neutralizantes elevados podría inhibir la capacidad de las citoquinas de ejercer su acción terapéutica, lo cual impacta de forma directa en su eficacia [169].



**Figura 27.** Se determinó la producción de anticuerpos específicos totales (A) y neutralizantes (B) para las distintas variantes de GMOP-IFN en las muestras de plasma de ratones HLA-DR1 inmunizados. Los títulos de anticuerpos neutralizantes en ratones inoculados con las versiones de-inmunizadas de GMOP-IFN presentan valores significativamente inferiores a los títulos de anticuerpos en ratones inoculados con la proteína original.

## »» DISCUSIÓN

Debido a su gran especificidad y eficacia, las proteínas recombinantes de uso terapéutico se han convertido en los productos farmacéuticos de elección para el tratamiento de una amplia variedad de patologías, incluyendo enfermedades autoinmunes, cáncer, enfermedades infecciosas y desórdenes genéticos [170]. En la actualidad, más de 180 proteínas terapéuticas y péptidos han sido aprobados por la FDA, muchos de los cuales no exhiben propiedades farmacocinéticas óptimas. Esto se debe tanto a la existencia de mecanismos de filtración glomerular y procesos de degradación metabólica, que disminuyen significativamente su presencia en circulación [171], como al desarrollo de respuestas inmunes contra el terapéutico, con la consiguiente producción de ADAs, que pueden unirse a la droga inhibiendo su efecto o alterando su farmacocinética.

La inmunogenicidad de las proteínas de uso terapéutico humano puede tener un impacto directo tanto en la eficacia como en la seguridad de estos medicamentos. Por lo tanto, el estudio de tal característica constituye un análisis crítico en el desarrollo de nuevos productos terapéuticos, siendo incluso requerido para la aprobación de los mismos por las principales agencias regulatorias a nivel mundial [172]. En efecto, durante las últimas décadas, organismos internacionales como la FDA, en Estados Unidos y la EMA, en Europa, han elaborado guías detalladas que incluyen lineamientos y especificaciones acerca de cómo abordar el estudio de la inmunogenicidad de los productos biológicos, en las distintas etapas de su desarrollo. Dentro de estas recomendaciones, el análisis predictivo de secuencias proteicas y su validación por medio de estudios *in vitro* e *in vivo* se destacan como ensayos que no necesariamente reflejarán exactamente la respuesta inmune en humanos, pero que permiten determinar con cierta precisión el riesgo de inmunogenicidad del producto en etapas pre clínicas del desarrollo [173,174].

Por lo tanto, teniendo en cuenta la importancia del análisis de la inmunogenicidad de los productos biológicos innovadores, en el presente trabajo se empleó el paquete de herramientas inmunoinformáticas desarrollado por la compañía *EpiVax Inc.* para analizar la inmunogenicidad potencial de una variante del rhIFN- $\alpha$ 2b desarrollada recientemente en nuestro laboratorio y denominada GMOP-IFN [45]. Esta proteína presenta comprobada actividad biológica antiviral y características farmacocinéticas mejoradas con respecto a su contraparte comercial, debido al incremento en el contenido de glicosilaciones derivadas de la etiqueta peptídica GMOP, fusionada al extremo N-terminal de la citoquina.

Una experiencia reciente en el desarrollo de un análogo recombinante del factor VII activado de la cascada de coagulación sanguínea humana (rhFVIIa), Vatreptagcog alfa, indica



que incluso pequeños cambios en la secuencia de una proteína pueden causar efectos significativos en su inmunogenicidad. Esto pone de manifiesto la importancia de las estrategias que permiten determinar, en etapas tempranas del desarrollo, el impacto de la introducción de neo-epitopes en la inmunogenicidad del producto innovador. Vatreptacog alfa presenta tres mutaciones puntuales en la secuencia del rhFVIIa, lo que le permitió proveer una opción terapéutica más eficiente frente a episodios de sangrado en pacientes con hemofilia. En otras palabras, se obtuvo un fármaco mejorado desde el punto de vista de su actividad enzimática en plaquetas activadas, en comparación con el rhFVIIa nativo [175–178]. Durante los estudios de fase pre clínica del terapéutico innovador no se obtuvieron resultados controversiales en cuanto a su inmunogenicidad, ni tampoco se detectaron ADAs durante los estudios de fase clínica I y II. Asimismo, estudios realizados en modelos animales tolerantes tampoco detectó una inmunogenicidad incrementada de Vatreptacog alfa con respecto a rhFVIIa [179]. Sin embargo, en un estudio aleatorizado controlado correspondiente a la fase III, la administración de Vatreptacog alfa dio lugar al desarrollo de ADAs en un 11% de los pacientes involucrados [180], por lo cual el desarrollo del terapéutico fue finalmente discontinuado. Resulta interesante resaltar que, posteriormente, Lamberth y col. [76] demostraron por medio del uso de herramientas predictivas *in silico* y la realización de ensayos *in vitro* y *ex vivo*, la presencia de neo-epitopes en la secuencia de Vatreptacog alfa, comprobando además la existencia de una estrecha correlación entre estos resultados y los provenientes de estudios clínicos.

### **1. DESARROLLO DE VARIANTES DE-INMUNIZADAS: DE LA PREDICCIÓN AL DISEÑO**

Luego de realizar el análisis *in silico* de GMOP-IFN, el cual arrojó un elevado *score* de inmunogenicidad global, resultó esencial proponer el diseño de una versión que conserve sus propiedades destacadas con respecto al producto comercial y que presente además una inmunogenicidad reducida.

El estudio *in silico* de la inmunogenicidad fue llevado a cabo por medio de la evaluación de la inmunogenicidad potencial de cada péptido frente a un panel de ocho alelos prototípicos del HLA-DRB1 que representan el 90% de la diversidad de moléculas del CMH-II en la población mundial. Las moléculas del HLA de clase II se encuentran codificadas en diferentes *loci* (HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ) cada uno de ellos con elevado polimorfismo, cualidad asociada a la mayor probabilidad de supervivencia frente a la amplia variedad de agentes infecciosos. Diversos estudios han revelado que las moléculas del HLA codificadas por cada uno de estos loci presentan un grado de solapamiento significativo en términos del repertorio

de péptidos que son capaces de alojar [181–183]. Debido al acelerado avance en el campo de la inmunoinformática, en la actualidad sería posible ampliar el espectro de estas predicciones, empleando herramientas desarrolladas en base a otros conjuntos de alelos prototípicos que incluyen los alelos del HLA-DRB1, HLA-DRB3/4/5, HLA-DP y HLA-DQ [184,185].

La siguiente instancia en el diseño de las variantes de-inmunizadas de GMOP-IFN involucró la determinación de la contribución relativa de cada aminoácido en la inmunogenicidad del péptido completo, analizando asimismo la posibilidad de realizar cambios conservativos en la molécula, es decir, evitando la introducción de mutaciones que generen disrupciones estructurales y/o funcionales en la misma. Esta tarea fue desarrollada a partir de la combinación manual de los datos provenientes del análisis *in silico* y de la información recabada de la bibliografía relacionada con la identificación de aquellos residuos críticos para la actividad del hIFN- $\alpha$ 2b [156,157,186]. No obstante, actualmente diversas herramientas han sido desarrolladas para lograr este propósito, las cuales apuntan a resolver la necesidad de mejorar la efectividad, eficiencia y aplicabilidad de las tecnologías de de-inmunización, optimizando el tiempo invertido en el diseño del producto mejorado. Éstas consisten en un conjunto de algoritmos de diseño de proteínas que integran la predicción computacional de epitopes T inmunogénicos con el análisis del impacto que genera la introducción de un cambio en la secuencia (o estructura) de la proteína en su estabilidad o funcionalidad [75,187].

Resulta importante destacar que los epitopes para células T-CD4<sup>+</sup> pueden ser tanto inmunogénicos, es decir que tienen la capacidad de activar células T colaboradoras que darán lugar a la consiguiente activación y maduración de los linfocitos B productores de ADAs, como tolerogénicos (Tregitopes), los cuales al ser presentados a linfocitos T reguladores direccionarán la maduración de la respuesta inmune hacia un perfil regulatorio [153]. Por lo tanto, mientras que la remoción de epitopes para células T colaboradoras podrían conducir a una reducción de la inmunogenicidad potencial de un terapéutico, la identificación y aumento de las respuestas tolerogénicas por medio de la preservación o aumento del contenido de Tregitopes en una secuencia proteica, proceso conocido como ingeniería inmune o “tolerización”, constituye una alternativa novedosa al proceso de de-inmunización descrito en este trabajo [188]. Si bien la mayoría de estas estrategias todavía se encuentran en etapa de desarrollo, numerosos regímenes de tolerización han sido implementados en la clínica. Estas estrategias incluyen el uso de drogas disponibles en el mercado dirigidas contra los componentes más importantes de la vía que desencadena el desarrollo de ADAs, ya sea por medio de la inhibición de respuestas efectoras o mediante la activación de mecanismos tolerogénicos. Esto constituye un incentivo para continuar con la evaluación de la inducción de

tolerancia como un mecanismo para mitigar el riesgo de inmunogenicidad en los bioterapéuticos.

Una vez identificado un potencial epítopo y las posibles mutaciones a introducir para reducir su inmunogenicidad, las predicciones pueden ser validadas, en una primera instancia, mediante ensayos *in vitro* de unión a moléculas HLA. Estos ensayos permiten evaluar la capacidad que presentan un conjunto de péptidos sintéticos de unirse a uno o más alelos prototípicos del HLA. Estos alelos prototípicos constituyen familias de alelos HLA-DR que comparten motivos de unión a epítopos, característica que permite realizar ensayos de unión con un número relativamente bajo de alelos, logrando así una cobertura superior al 95% de la diversidad presente en la población mundial [153]. Desarrollos experimentales reportados por nuestro grupo de trabajo [39] permitieron identificar un conjunto de modificaciones que generan un impacto relevante en la afinidad de unión a las moléculas del HLA-II en diferentes epítopos presentes en el IFN-4N. Esta información permitió validar la gran mayoría de las modificaciones propuestas.

## **2. PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE-INMUNIZADAS**

Durante la etapa de producción de las muteínas de-inmunizadas, se analizaron los niveles de expresión de proteína por medio de ensayos de ELISA sándwich. Si bien la resistencia a la presión con puromicina fue similar para todas las líneas celulares, se registraron grandes diferencias en los niveles de concentración de proteína en los sobrenadantes de cultivo de las líneas celulares productoras de GMOP-IFN-VAR1 y GMOP-IFN-VAR4 con respecto a los obtenidos para GMOP-IFN-VAR2 y GMOP-IFN-VAR3. Los bajos niveles de expresión de las dos primeras podrían deberse a factores relacionados con el proceso de integración del transgén y elementos regulatorios involucrados en el control transcripcional, número de copias del transgén introducidas y sitio de integración en el genoma, procesamiento del ARN, entre otros [189].

Desde el punto de vista de la masa molecular aparente, los resultados obtenidos no fueron más alentadores para las proteínas GMOP-IFN-VAR1 y GMOP-IFN-VAR4. Si bien ambas exhibieron una banda principal con similar movilidad electroforética a la obtenida para la proteína no de-inmunizada, se detectó además una banda de bajo peso molecular, con un tamaño similar al IFN- $\alpha$ 2b no glicosilado.

Aunque no se ha definido una secuencia consenso que guíe la introducción de *O*-glicosilaciones en residuos de Ser o Thr, se cree que el plegamiento de la proteína tiene un rol importante en la posición y número de *O*-glicanos que se adicionan, al determinar la

conformación que adoptará cada región de la misma. El plegamiento que adopte la cadena polipeptídica naciente condicionará el acceso de las transferasas de N-acetilgalactosamina responsables de la adición del primer residuo de N-acetilgalactosamina (GalNAc), a partir de la cual tendrá lugar la transferencia de los siguientes azúcares, a través de distintos tipos de unión [190]. Una posible explicación para los resultados obtenidos podría involucrar la ocurrencia de plegamientos incorrectos debido a la naturaleza de las mutaciones introducidas, impidiendo la adecuada producción y glicosilación de las citoquinas.

Notablemente, GMOP-IFN-VAR1 y GMOP-IFN-VAR4 también presentaron valores de actividad biológica antiviral y antiproliferativa extremadamente bajos con respecto a su contraparte no modificada. Ensayos de mutagénesis sitio-dirigida realizados con el objetivo de identificar las regiones moleculares relevantes en la interacción del hIFN- $\alpha$ 2 con las subunidades IFNAR-1 e IFNAR-2 del receptor permitieron determinar la importancia de ciertos residuos en la actividad biológica antiviral y antiproliferativa de la citoquina [157]. La combinación de las mutaciones L80A, Y85A y Y89A en una misma molécula causó una disminución drástica en la actividad biológica antiviral del rhIFN- $\alpha$ 2. Al adicionar a la triple mutante la mutación N65A, se evidenció un dramático descenso en su potencia antiviral (alrededor de 100 veces menor). La modificación N65A del IFN- $\alpha$ 2 se corresponde con la mutación N79A en la secuencia de GMOP-IFN, debido a los 14 aminoácidos del péptido GMOP fusionado al extremo N-terminal de la proteína. Si bien todas las mutaciones realizadas pueden generar disrupciones conformacionales o impedimentos estéricos que disminuyan la afinidad de unión de la proteína con el receptor IFNAR, resulta plausible suponer que la modificación N79A podría ser responsable del descenso abrupto observado en la potencia antiviral de las variantes en las que fue introducida, GMOP-IFN-VAR1 y GMOP-IFN-VAR4.

Nuevamente cabe mencionar que la caída abrupta en los valores de actividad antiviral observada para GMOP-IFN-VAR1 y GMOP-IFN-VAR4, la escasa masa recuperada para cada una de ellas, así como los bajos porcentajes de pureza obtenidos motivaron la exclusión de estas dos proteínas de los estudios posteriores.

Por su parte, las variantes GMOP-IFN-VAR2 y GMOP-IFN-VAR3, que retuvieron gran porcentaje de la actividad antiviral específica con respecto a su contraparte no de-inmunizada (72% y 35%, respectivamente), también presentaron una potencia antiproliferativa prácticamente nula. Este comportamiento tiene sustento en el hecho de que una fuerte interacción ligando-receptor es requerida para ejercer la respuesta de inhibición de la proliferación, mientras que el estado antiviral puede ser inducido incluso cuando esa afinidad es baja. En este sentido, partiendo de la información disponible sobre la energía involucrada en las interfases de unión ligando-receptor y la posibilidad de reducir y aumentar de forma

sistematizada las afinidades de unión de diferentes tipos de hIFNs hacia las dos subunidades del receptor IFNAR, se demostró que existe un elevado grado de correlación entre la activación de las diferentes vías de señalización, que desencadenan las funciones biológicas antiviral o antiproliferativa, y la afinidad de unión hacia las diferentes subunidades del receptor IFNAR. Estos estudios concluyeron que la activación de la cascada transcripcional que culmina en la activación del estado antiviral se encuentra mediada por el complejo receptor IFNAR en el contexto de interacciones de baja afinidad, mientras que se requieren elevadas afinidades de unión para que tengan lugar los eventos de transducción de señales mediadores de una respuesta inhibitoria del crecimiento [186]. Tales observaciones no resultan sorprendentes, teniendo en cuenta la relación variable que existe entre las potencias antiproliferativa y antiviral en los diferentes hIFNs de tipo I, pese a que las diferencias en su secuencia primaria sean leves [191]. También se ha sugerido que podrían existir mecanismos de retroalimentación negativos involucrados en el direccionamiento de las actividades diferenciales de estas citoquinas, considerando los tiempos de exposición prolongados requeridos para que tenga lugar el proceso de señalización celular que lleva al desarrollo de la respuesta antiproliferativa [192].

En este punto resulta conveniente destacar que la elevada actividad antiproliferativa del rhIFN- $\alpha$  está asociada a la ocurrencia de desórdenes hematológicos indeseados durante la terapia con esta citoquina. En este sentido, existen reportes que muestran la aparición de cuadros de anemia, leucopenia, neutropenia y trombocitopenia en pacientes con hepatitis C crónica tratados con rhIFN- $\alpha$  pegilado en combinación con ribavirina [193]. En efecto, se ha descrito que dosis terapéuticas del rhIFN- $\alpha$ 2a pueden disminuir el número total de neutrófilos en un 30%-50%, incrementando así la susceptibilidad a infecciones graves (bacterianas, víricas y fúngicas) [194]. Por lo tanto, la actividad antiproliferativa prácticamente nula en las variantes de-inmunizadas de IFN desarrolladas en este trabajo, constituye una ventaja adicional para su aplicación terapéutica.

### **3. CONTENIDO DE O-GLICANOS Y SU INFLUENCIA EN LA ACTIVIDAD IN VIVO DE LAS VARIANTES DE-INMUNIZADAS DE GMOP-IFN**

La adición de glicanos a las proteínas producidas por células eucariotas constituye un evento co/post-traducciona clave en la producción de glicoproteínas de uso terapéutico. En este sentido, mientras que la función biológica de muchas proteínas está definida por su secuencia aminoacídica, el componente glucídico de una glicoproteína terapéutica resulta fundamental en la determinación de su actividad biológica, perfil farmacocinético, secreción,

solubilidad, interacción con receptores de superficie y antigenicidad, entre otras características [195]. Por este motivo, la caracterización del perfil de glicofomas asociado a cada proteína resulta imprescindible.

En general, las glicoproteínas poseen un rango de estructuras glicosídicas asociadas a cada sitio probable de *O*-glicosilación, como también diferente número de sitios efectivamente unidos a estructuras glicosídicas. Al caracterizar la heterogeneidad de GMOP-IFN y sus variantes, GMOP-IFN-VAR2 y GMOP-IFN-VAR3, en cuanto al contenido de isoformas de diferente carga eléctrica por medio de IEF, fue posible identificar la presencia de diversas estructuras *O*-glicosídicas con diferente grado de sialilación. Ambas proteínas de-inmunizadas exhibieron un incremento en el número de isoformas más ácidas, lo cual se debería a la presencia de estructuras glicosídicas con mayor contenido de ácido siálico, con respecto a la molécula original. Resulta conveniente destacar que el contenido de ácido siálico contribuye a la estabilidad de la molécula al restringir la unión a los receptores de asialo-glicoproteínas hepáticos que tienen especificidad por residuos de galactosa o GalNAc terminales. Además, un mayor contenido de ácido siálico contribuye a reducir la velocidad de filtración renal debido a la repulsión electrostática que se produce entre las cargas negativas de las proteínas y los glicosaminoglicanos de la superficie glomerular [196]. Sin embargo, si bien el incremento relativo en el número de glicofomas más ácidas resulta favorable desde el punto de vista del aumento de la vida media y estabilidad de la citoquina en suero, también suele estar asociado con una reducción de la actividad biológica mediada por receptores [42]. Esto podría explicar la reducción en los niveles de las actividades antiviral y antiproliferativa específicas de las proteínas de-inmunizadas con respecto a la molécula original.

Los resultados obtenidos a partir de las predicciones *in silico* sobre la probabilidad de *O*-glicosilación están en concordancia con los perfiles migratorios observados a partir de los ensayos de SDS-PAGE para las proteínas GMOP-IFN, GMOP-IFN-VAR2 y GMOP-IFN-VAR3. Estos resultados indicaron que la fusión del péptido GMOP al extremo N-terminal del hIFN- $\alpha$ 2b fue exitosa, dando lugar a un incremento en el contenido de *O*-glicanos, con el consiguiente aumento de la masa molecular y la carga negativa. Todas las proteínas presentaron una masa molecular aparente similar, lo cual indica que el número de sitios probables de *O*-glicosilación es constante para las tres proteínas.

Numerosos estudios ponen en evidencia el impacto que presentan las glicosilaciones en la actividad biológica *in vivo* de las proteínas. Por ejemplo, el terapéutico Darbepoetin alfa, un análogo hiperglicosilado de la eritropoyetina humana recombinante (rhEPO), presenta una vida media plasmática tres veces mayor con respecto a la rhEPO y una actividad biológica *in vivo* superior. Sin embargo, esta variante mostró una notable disminución en la capacidad de

unión *in vitro* al receptor. A pesar de esto, las mejoras observadas en la respuesta biológica *in vivo* lo constituyen como una alternativa terapéutica prometedora [197].

Por tal motivo, se realizó la caracterización del perfil farmacocinético de las glicoproteínas desarrolladas en este trabajo de Tesis. Los resultados obtenidos indican que las variantes hiperglicosiladas de IFN presentaron un comportamiento similar tanto en la fase de distribución como en la de eliminación, con valores de  $T_{m\acute{a}x}$  y  $t_{1/2elim}$  mejorados con respecto a los reportados para IFN-WT y la citoquina comercial [42]. Por otro lado, la reducción en la velocidad de depuración plasmática observada para GMOP-IFN-VAR3 con respecto a los correspondientes valores de  $Cl_{app}$  de GMOP-IFN y GMOP-IFN-VAR2 sugiere que las modificaciones introducidas con el objetivo de reducir la inmunogenicidad de GMOP-IFN-VAR3 resultaron además en la generación de isoformas con mayor capacidad de permanencia en circulación. A partir de la información obtenida mediante focalización isoelectrónica, se pudo observar una menor intensidad en la banda correspondiente a la glicofoma menos ácida de GMOP-IFN-VAR3, indicando una diferencia en el contenido de glicofomas con respecto a GMOP-IFN-VAR2. Esto se ve reflejado en el aumento de su tiempo de residencia en circulación y, consecuentemente, en su potencia *in vivo*, con respecto a las otras proteínas en estudio. Sin embargo, esto también puede ser el motivo de la disminución en la capacidad de unión *in vitro* al receptor, que se puso en evidencia en la reducción de la ABAV.

En conjunto, estos resultados señalan que las variantes de-inmunizadas mantuvieron intactos los parámetros farmacocinéticos mejorados que presenta la molécula GMOP-IFN, incluso con una mejora adicional en la versión GMOP-IFN-VAR3. Es importante señalar que según el perfil farmacocinético de una molécula se ajustarán el tamaño y la frecuencia de la dosis requerida para ejercer su acción terapéutica, atributos particularmente relevantes para productos biológicos de inyección periódica, como es el caso del rhIFN- $\alpha 2b$ . Por este motivo, conservar las características mejoradas en cuanto a la extensión de la vida media plasmática de la citoquina resulta de particular importancia, fundamentalmente en el tratamiento de enfermedades crónicas tales como la Hepatitis B y C, los cuales involucran la administración de dosis frecuentes del terapéutico durante períodos prolongados. En efecto, un mayor tiempo de vida media en circulación constituye un atributo de tal relevancia a los fines de alcanzar la eficacia terapéutica requerida, que en numerosas ocasiones se pondera dicha característica a expensas de su actividad biológica *in vitro*. Un claro ejemplo de esto lo constituye la versión pegilada del h-IFN $\alpha 2$  (PEGASYS), la cual presenta apenas entre 5-10% de la actividad antiviral *in vitro* de la versión sin pegilar. En ensayos clínicos, esta variante evidenció un aumento significativo en la efectividad terapéutica contra la infección por el HCV [198].

#### 4. EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE LAS VARIANTES DE-INMUNIZADAS DE GMOP-IFN

##### 4.1. Activación *ex vivo* de linfocitos T antígeno-específicos en muestras de CMSP humana

Los algoritmos empleados para evaluar la inmunogenicidad potencial de una proteína de uso terapéutico en base a su contenido de epitopes para células T requieren de un extenso proceso de validación, de manera tal de acotar la discrepancia entre estos estudios y los ensayos clínicos. En este trabajo, la evaluación del efecto en la reducción del contenido total de epitopes para células T de las mutaciones introducidas en cada variante de GMOP-IFN se llevó a cabo por medio de un ensayo experimental *ex vivo*. Los resultados obtenidos mostraron que las dos variantes en estudio, GMOP-IFN-VAR2 y GOMP-IFN-VAR3, presentaron una inmunogenicidad reducida con respecto a la molécula original. GMOP-IFN-VAR2 evidenció una reducción del 55% de la inmunogenicidad potencial con respecto a GMOP-IFN, mientras que GOMP-IFN-VAR3 también generó una respuesta inmune inferior que la molécula original, aunque en este caso en un 35% de los donantes estudiados.

Resulta conveniente destacar la variabilidad en los valores de IE entre los individuos analizados. Una posible explicación puede encontrarse en la heterogeneidad de haplotipos del HLA-II de la cohorte analizada y en el amplio repertorio de receptores de células T [199–201]. Además, debe también considerarse que la activación y mantenimiento de una respuesta inmune mediada por linfocitos T-CD4<sup>+</sup> requieren de la presencia de señales de co-estimulación apropiadas [202], factores que también pueden presentar cierta variabilidad entre las muestras analizadas.

El análisis de la diversidad en la composición de los alelos HLA-DRB1 expresados por los donantes de nuestra cohorte reveló una buena correlación con la correspondiente diversidad de estos alelos en la población mundial. En ocasiones, esto se correlaciona con la existencia de un rango de estabildades de unión entre las múltiples interacciones epítope antigénico *versus* molécula del CMH-II, que se extiende a lo largo de todo el espectro de moléculas del HLA de la población en estudio. Sin embargo, en este trabajo no fue posible establecer correlaciones entre los datos de activación linfocitaria obtenidos a partir de los ensayos *ex vivo* y el haplotipo de moléculas del HLA-DRB1 de cada donante. En numerosos casos, las respuestas inmunes contra proteínas administradas como terapéuticos o vacunas han sido vinculadas a un alelo específico del HLA, el cual presenta mayor capacidad para unir péptidos derivados del procesamiento antigénico de estos productos. La posibilidad de establecer este tipo de correlación resulta de gran utilidad, por ejemplo, al momento de



diseñar los ensayos clínicos, permitiendo excluir de estos ensayos a aquellos individuos que expresen específicamente estos alelos [203].

Si bien la expresión de ciertas moléculas del CMH-II se ha asociado a un mayor riesgo de desarrollo de ADAs [204], la respuesta inmune que desarrolle un individuo dependerá además de su estado inmunológico. Esto fue caracterizado en profundidad por Tsang y col., en un estudio en el que además han logrado establecer modelos computacionales predictivos a partir del análisis del patrón de expresión génica en muestras de CMSP provenientes de diferentes individuos, la frecuencia de las poblaciones celulares y los niveles séricos de citoquinas y proteínas iniciadoras de la activación del sistema inmune [205].

Actualmente se están desarrollando simuladores basados en la Farmacología Cuantitativa de Sistemas (QSP, por sus siglas en inglés), que permitirían simplificar y homogeneizar la integración de diferentes tipos de riesgos en la evaluación del riesgo de inmunogenicidad global de una proteína terapéutica. Estas herramientas incorporan las propiedades farmacocinéticas de los bioterapéuticos, basadas en estudios fisiológicos, y modelos mecanísticos de las respuestas inmunes para simular ensayos clínicos de gran escala y predecir la incidencia de la inmunogenicidad. Este tipo de modelos permiten evaluar el impacto que producen variables críticas como los haplotipos del HLA, terapias combinatorias, regímenes de dosaje y ruta de administración en la generación de ADAs, así como también la influencia del desarrollo de ADAs en las propiedades farmacocinéticas del terapéutico. Una vez optimizados y validados, estos simuladores podrían dar lugar a un análisis y mitigación de la inmunogenicidad en forma personalizada [206].

#### **4.2. Interpretación de los resultados del análisis de la inmunogenicidad in vivo: modelos de animales transgénicos**

Si bien los ensayos *ex vivo* basados en la activación de células T constituyen herramientas de gran utilidad en las etapas tempranas del desarrollo de un candidato terapéutico, deben ser complementados con otros estudios que permitan predecir con mayor precisión la inmunogenicidad de estos productos en la clínica.

Los modelos animales tales como ratones o primates no humanos son muy utilizados para predecir la toxicidad de la dosis límite y para diseñar los rangos de dosaje para los ensayos clínicos de fase I. Sin embargo, este tipo de estudios no permite predecir de forma adecuada la inmunogenicidad en humanos. De hecho, los estudios de producción de ADAs en modelos animales han sido recomendados sólo como un aspecto más a considerar dentro de la evaluación de la toxicidad de los candidatos terapéuticos por las agencias regulatorias. No obstante, la FDA sugiere el uso de modelos de animales transgénicos como sistemas de gran

utilidad para establecer las consecuencias del desarrollo de ADAs en estudios comparativos de inmunogenicidad entre diferentes variantes de un bioterapéutico [69].

Por lo tanto, en el presente trabajo de Tesis, el estudio complementario de la inmunogenicidad de las variantes de-inmunizadas de GMOP-IFN se llevó a cabo empleando un modelo de ratones transgénicos. Estos ratones fueron modificados genéticamente de manera tal que su sistema de presentación antigénica endógeno (H2 de Clase I y II) ha sido eliminado y sustituido por alelos que codifican para proteínas del CMH humano (específicamente HLA-A2.1 y HLA-DR1). Una limitación que presenta el modelo empleado radica en que la restricción del HLA a un único alelo da como resultado un genotipo homocigota, lo cual es de muy rara ocurrencia en humanos, por lo que este tipo de ratones por lo general carecen de la capacidad de montar respuestas policlonales robustas y con maduración de la afinidad [96]. Por este motivo, a los efectos de alcanzar una respuesta inmune detectable, el plan de inmunización empleado en este trabajo incluyó el uso de adyuvantes completo e incompleto de Freund.

La utilización de ratones transgénicos que expresan moléculas del HLA-II específicas restringe el enfoque al análisis de la influencia de unas pocas proteínas, del gran número de protagonistas involucrados en la modulación de las respuestas inmunes. Sin embargo, las moléculas del HLA-II son esenciales en la presentación antigénica a los linfocitos T-CD4<sup>+</sup>, estando incluso involucradas en la generación del repertorio de linfocitos T-CD4<sup>+</sup> en el timo y en la regulación de la respuesta inmune adaptativa que involucra a este tipo de linfocitos en la periferia. Por este motivo, el uso de estos animales transgénicos constituye un modelo muy acertado para evaluar la inmunogenicidad *in vivo* de las proteínas de uso terapéutico.

Los resultados obtenidos a partir de la titulación de anticuerpos totales específicos contra las proteínas en estudio muestran una reducción de la inmunogenicidad *in vivo* para GMOP-IFN-VAR3. Sin embargo, tanto GMOP-IFN-VAR2 como GMOP-IFN-VAR3 exhibieron una marcada reducción en los títulos de anticuerpos neutralizantes con respecto a la molécula original. Este resultado pone de manifiesto que, si bien la respuesta inmune humoral contra GMOP-IFN-VAR2 resultó similar a la detectada para GMOP-IFN, los anticuerpos desarrollados contra la variante de-inmunizada afectaron en menor medida la función antiviral de la molécula.

Resulta conveniente mencionar que un tipo de ácido siálico inmunogénico, el ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc), puede ser incorporado como unidad terminal de la estructura glicosídica de una proteína cuando ésta es expresada en un huésped no humano, como las células CHO-K1. En efecto, en nuestro laboratorio se ha demostrado la presencia de un contenido elevado de Neu5Gc en la proteína IFN-4N producida en células CHO-K1 [1]. El Neu5Gc constituye la forma hidroxilada del ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac),

transformación que es llevada a cabo por una enzima específica, ausente en la maquinaria enzimática de las células humanas. La presencia de anticuerpos específicos en circulación que reconocen este tipo de glico-epitope se ha documentado extensamente [207], motivo por el cual es posible inferir que el mayor contenido de ácido siálico en GMOP-IFN-VAR3, con respecto a GMOP-IFN-VAR2, podría haber conducido a un incremento en la activación de células T-CD4<sup>+</sup> específicas para dichos epitopes en los ensayos *ex vivo*. Debido a que este tipo de ácido siálico es un componente natural de las proteínas murinas, el aumento en el contenido de ácido siálico de la proteína GMOP-IFN-VAR3 no habría ejercido efectos en la respuesta inmune desarrollada en ratones. Esto podría explicar ciertas discrepancias en los resultados derivados de los estudios de la inmunogenicidad *ex vivo* e *in vivo* de las proteínas analizadas en este trabajo. No obstante, para confirmar esta suposición sería necesario realizar ensayos de cuantificación del contenido de ácido siálico total, así como la proporción relativa de Neu5Gc y Neu5Ac, en ambas variantes.

La obtención de bajos títulos de anticuerpos neutralizantes de la actividad biológica para ambas proteínas de-inmunizadas reviste una gran importancia, ya que éstos pueden inhibir la capacidad de estas proteínas de ejercer su acción, lo cual impacta en forma directa en la eficacia de estos candidatos terapéuticos.

El desarrollo de modelos animales se ha enfocado en lograr respuestas que presenten elevada sensibilidad y que permitan identificar diferencias en la inmunogenicidad de distintos candidatos terapéuticos y/o vacunales. Sin embargo, aún se desconoce la relación que existe entre una mayor respuesta inmune *in vivo* y el riesgo que esto implica en la clínica. Para lograr establecer este tipo de relaciones será necesario desarrollar vínculos entre los resultados obtenidos a partir de los ensayos realizados en los diversos modelos animales disponibles y la información recolectada tanto durante los ensayos clínicos, como en las etapas posteriores de farmacovigilancia.

# »» CONCLUSIONES

El desarrollo exitoso de plataformas tecnológicas que permitan potenciar las características funcionales de los productos terapéuticos y a la vez extender el tiempo de depuración de la droga y reducir la frecuencia de administración, resultan muy atractivas tanto desde el punto de vista de la efectividad como del sostenimiento y la tolerancia de las terapias. En este contexto, en nuestro laboratorio se desarrolló una variante del rhIFN- $\alpha$ 2b derivada de la fusión de la proteína a la etiqueta peptídica glicosilada GMOP, la cual presenta 4 sitios potenciales de *O*-glicosilación capaces de aportar residuos de ácido siálico adicionales a la citoquina [45]. El aumento del contenido de *O*-glicanos genera un incremento tanto en el tamaño hidrodinámico de la molécula como en su carga negativa, retrasando la remoción de la proteína a través de la barrera glomerular. En efecto, el candidato terapéutico resultante de dicha fusión, GMOP-IFN, presentó un perfil farmacocinético mejorado con respecto al IFN-WT y a la proteína terapéutica comercial, con un incremento notable en la vida media plasmática y una marcada reducción en los valores de *clearance* aparente.

Sin embargo, la posibilidad de inducir reacciones inmunes indeseadas constituye uno de los atributos críticos de los bioterapéuticos. En numerosos casos se ha reportado que la administración de una proteína terapéutica durante períodos prolongados puede dar lugar a un quiebre de la tolerancia inmunológica frente a la droga e incluso frente a antígenos propios, dando como resultado la producción de ADAs, que pueden unirse a la droga inhibiendo su efecto o provocando una alteración en su farmacocinética [208]. En este contexto, el objetivo del presente trabajo se centró en el análisis de la inmunogenicidad de la proteína de fusión GMOP-IFN y en el desarrollo de variantes con inmunogenicidad reducida, sin causar un impacto negativo en su estructura y función biológica.

En las últimas dos décadas, se han desarrollado numerosos algoritmos computacionales que permiten evaluar la presencia de epitopes potencialmente reconocidos por células T humanas en proteínas de uso terapéutico [83]. En particular, en el presente trabajo se llevó a cabo un análisis *in silico* empleando las herramientas inmunoinformáticas comprendidas dentro de la interfase ISPRI (*EpiVax Inc.*) que permitió identificar seis regiones potencialmente inmunogénicas en la proteína. Es importante resaltar que, según los análisis predictivos, la fusión de la etiqueta peptídica GMOP al hIFN- $\alpha$ 2b no habría generado neo-epitopes dentro de la secuencia del candidato terapéutico.

Una vez identificados los epitopes potenciales y las mutaciones a introducir en sus secuencias para reducir su inmunogenicidad, se confirmaron tales predicciones por medio de desarrollos experimentales reportados por nuestro grupo de trabajo [39]. La identificación del

conjunto de modificaciones que generan un impacto significativo en la afinidad de unión a las moléculas del HLA-II en diferentes epitopes presentes en el IFN-4N, permitió validar la mayoría de las modificaciones propuestas para la de-inmunización de GMOP-IFN.

El análisis de estos resultados, en adición al conocimiento previo de aquellos residuos críticos para mantener la estructura y la actividad del hIFN- $\alpha$ 2b, permitió establecer una serie de mutaciones puntuales que, en conjunto, conducirían a una reducción de la inmunogenicidad de la proteína. Estas modificaciones fueron introducidas en distintas combinaciones generando cuatro variantes de-inmunizadas de GMOP-IFN.

A partir de las secuencias nucleotídicas de cada variante de GMOP-IFN de-inmunizado se generaron las partículas lentivirales correspondientes, que luego se utilizaron para transducir células CHO-K1 y generar líneas celulares estables productoras de cada proteína. El cultivo de las líneas celulares productoras de GMOP-IFN-VAR2 y GMOP-IFN-VAR3 permitió obtener rendimientos de producción de cada proteína acordes con los requeridos para la realización de los ensayos subsiguientes. Sin embargo, se registraron concentraciones muy bajas de GMOP-IFN-VAR1 y GMOP-IFN-VAR4 en los sobrenadantes de los cultivos celulares. No obstante, por medio de sucesivos ciclos de cromatografía de inmunoafinidad fue posible recuperar suficiente masa de las cuatro variantes, obteniendo niveles de pureza superiores al 94% para las proteínas GMOP-IFN-VAR2 y GMOP-IFN-VAR3. En contraste, los niveles de pureza alcanzados para GMOP-IFN-VAR1 y GMOP-IFN-VAR4 fueron considerablemente más bajos (80% aproximadamente). Además, los resultados obtenidos del ensayo de SDS-PAGE revelaron que, si bien en todos los casos se observó una banda principal con movilidad electroforética similar a la de GMOP-IFN, en las calles correspondientes a GMOP-IFN-VAR1 y GMOP-IFN-VAR4 se detectó una banda adicional, de bajo peso molecular, con un tamaño correspondiente al rhIFN- $\alpha$ 2b no glicosilado.

La caracterización funcional *in vitro* de GMOP-IFN-VAR1 y GMOP-IFN-VAR4 presentó porcentajes de actividad biológica antiviral residual de 0,06% y 0,17%, respectivamente, con respecto a su contraparte no modificada. En consecuencia, se decidió excluir a estas dos proteínas de los ensayos de caracterización posteriores.

En cuanto a la acción antiviral de las variantes de-inmunizadas GMOP-IFN-VAR2 y GMOP-IFN-VAR3, los ensayos de caracterización *in vitro* mostraron una elevada actividad antiviral específica con respecto a la molécula original, reteniendo el 72% y 35%, respectivamente. Además, es importante resaltar que la potencia antiproliferativa exhibida por ambas moléculas fue prácticamente nula. Tal característica constituye una ventaja adicional para estos candidatos terapéuticos, ya que la actividad antiproliferativa del rhIFN- $\alpha$

ha sido asociada con el desarrollo de desórdenes hematológicos indeseados durante tratamientos con la proteína terapéutica [193,194].

Por otro lado, a partir de la caracterización estructural de las proteínas mediante focalización isoelectrónica, fue posible verificar la existencia de diversas estructuras *O*-glicosídicas con diferente grado de sialidación en GMOP-IFN y sus dos variantes, GMOP-IFN-VAR2 y GMOP-IFN-VAR3. Este análisis reveló la presencia de un mayor número de isoformas más ácidas en las calles correspondientes a las proteínas de-inmunizadas, lo cual está asociado a la existencia de estructuras glicosídicas con mayor contenido de residuos de ácido siálico, con respecto a la molécula original. Estos residuos cargados negativamente favorecen la repulsión electrostática de la citoquina con los glucosaminoglicanos de los poros glomerulares, retrasando así la remoción de la proteína a través de la barrera glomerular.

Los resultados de los ensayos de SDS-PAGE e IEF para GMOP-IFN, GMOP-IFN-VAR2 y GMOP-IFN-VAR3, analizados en conjunto con los datos arrojados por las herramientas informáticas de predicción de la probabilidad de *O*-glicosilación, empleando el servidor *NetOGlyc*, permitieron concluir que la fusión del péptido GMOP al extremo N-terminal del hIFN- $\alpha$ 2b fue exitosa en las dos variantes de-inmunizadas. Esto se vio reflejado tanto en el aumento de sus tamaños moleculares como en el mayor contenido relativo de isoformas más ácidas, con respecto al IFN-WT.

Además, teniendo en cuenta la influencia de la glicosilación en la actividad biológica *in vivo* de las proteínas, se realizó la caracterización del perfil farmacocinético de las glicoproteínas desarrolladas, empleando animales de experimentación. En conjunto, los resultados obtenidos a partir de estos estudios indicaron que las variantes de-inmunizadas mantienen intactos los parámetros farmacocinéticos mejorados que presenta GMOP-IFN, incluso con una mejora adicional en la potencia *in vivo* de la variante GMOP-IFN-VAR3, reflejado en el mayor tiempo de residencia en circulación. Estos resultados presentan una importancia fundamental en la clínica, particularmente en aquellos tratamientos que involucran la administración de dosis frecuentes del terapéutico durante períodos prolongados.

El aumento de la vida media de las moléculas generadas con respecto a la proteína no glicosilada se relaciona fundamentalmente con el incremento en su volumen hidrodinámico y su carga negativa y, en consecuencia, con la disminución de la tasa de filtración renal. Sin embargo, la eliminación del hIFN- $\alpha$ 2b de la circulación sanguínea también se encuentra mediada por mecanismos de proteólisis e inactivación por parte de las proteasas presentes en el suero. En este sentido, estudios previos han reportado un menor porcentaje de inactivación de las variantes hiperglicosiladas y pegiladas del rhIFN- $\alpha$ 2b, con respecto a su contraparte no

modificada [162]. Por lo tanto, ensayos futuros de caracterización *in vitro* de las variantes de-inmunizadas en presencia de suero humano, así como la evaluación de la resistencia a la acción de proteasas específicas, permitirán evaluar la estabilidad de las proteínas desarrolladas en el presente trabajo.

Por otra parte, los ensayos *ex vivo* con células del sistema inmune humano permitieron determinar el impacto de las mutaciones en la inmunogenicidad de las variantes de GMOP-IFN. A partir de los resultados obtenidos se pudo observar una disminución en la inmunogenicidad *ex vivo* para ambas variantes de-inmunizadas, con una reducción en las respuestas mediadas por la producción de IFN- $\gamma$  en el 55% de los donantes para el caso de la proteína GMOP-IFN-VAR2 y en el 35% para el caso de la variante GMOP-IFN-VAR3.

Asimismo, el análisis de la expresión de los alelos HLA-DRB1 de los donantes de la cohorte en estudio puso en evidencia una buena correlación entre la frecuencia de estos alelos con la correspondiente frecuencia alélica de la población mundial. Sin embargo, en el presente trabajo de Tesis no fue posible relacionar específicamente los haplotipos de estas moléculas con los resultados alcanzados en los ensayos de activación linfocitaria *ex vivo*.

Por otra parte, el tratamiento de células dendríticas de tres donantes (cuyas muestras de CMSP respondieron previamente a GMOP-IFN- $\alpha$ 2b) con dicha proteína y posterior tratamiento con un anticuerpo anti-HLA-DR, permitió confirmar la participación de las moléculas HLA-DR en la presentación antigénica y la consecuente activación linfocitaria.

Finalmente, se realizó un análisis de caracterización de la inmunogenicidad potencial *in vivo* de las variantes de-inmunizadas de GMOP-IFN, empleando ratones transgénicos, cuyo sistema de presentación antigénica endógeno ha sido sustituido por alelos que codifican para proteínas del CMH humano (HLA-A2.1 y HLA-DR1). Notablemente, los títulos de anticuerpos específicos, tanto totales como neutralizantes, para el grupo de ratones inoculados con GMOP-IFN-VAR3 fueron significativamente más bajos que los correspondientes al grupo tratado con la proteína original. Por su parte, los títulos de anticuerpos específicos totales obtenidos para los ratones inoculados con GMOP-IFN-VAR2 presentaron valores similares a los detectados para el grupo inmunizado con GMOP-IFN. No obstante, los títulos de anticuerpos neutralizantes del grupo de ratones tratados con la versión de-inmunizada resultaron significativamente menores a los del grupo de animales inoculados con la molécula GMOP-IFN. De aquí se pudo concluir que, por un lado, la inmunogenicidad potencial *in vivo* de GMOP-IFN-VAR3 es marcadamente inferior a la observada para la molécula sin de-inmunizar. Por otro lado, si bien los niveles de anticuerpos contra las moléculas GMOP-IFN y GMOP-IFN-VAR2 fueron similares, los anticuerpos desarrollados contra la variante de-inmunizada presentaron una menor capacidad neutralizante de la función antiviral de la molécula.



En conclusión, en el presente trabajo de Tesis se llevó a cabo una estrategia de de-inmunización de la proteína GMOP-IFN, una variante hiperglicosilada del hIFN- $\alpha$ 2b con mayor estabilidad plasmática. A partir del análisis preliminar *in silico* se desarrollaron dos variantes de-inmunizadas que conservaron una elevada proporción de la actividad antiviral original y nula actividad antiproliferativa. Asimismo, las variantes desarrolladas mantuvieron intactos los parámetros farmacocinéticos mejorados que presenta la molécula GMOP-IFN con respecto a la proteína terapéutica comercial. Por último, ambas muteínas exhibieron una inmunogenicidad *ex vivo* e *in vivo* marcadamente menor a la de la molécula original.

Es importante destacar que, frente a las numerosas situaciones de emergencia sanitaria causadas por el vertiginoso avance de los virus de origen zoonótico hacia nuevas áreas, la generación de estrategias terapéuticas efectivas resulta esencial. En este sentido, la experiencia más reciente la constituye el estallido de la pandemia causada por el SARS-CoV-2, frente a la cual el desarrollo de productos terapéuticos que logren la supresión viral y reduzcan el riesgo de progresión hacia el cuadro severo de la enfermedad resulta de particular importancia, fundamentalmente para individuos con escasa o nula efectividad frente a la vacunación.

Teniendo en cuenta la comprobada eficacia del rhIFN- $\alpha$ 2b para el tratamiento de pacientes diagnosticados con COVID-19 [101,102], y los resultados alentadores previamente reportados en cuanto a la potencia antiviral de la proteína terapéutica frente a virus emergentes como ZIKV [114,117], CHIKV [118,119] y DENG V [120], se puede concluir que las variantes de-inmunizadas de GMOP-IFN desarrolladas en el presente trabajo presentan características únicas desde el punto de vista de su inmunogenicidad, actividad biológica y perfil farmacocinético, constituyendo candidatos terapéuticos muy promisorios para el tratamiento de infecciones virales humanas.

# »» BIBLIOGRAFÍA

- [1] Gugliotta A, Ceaglio N, Raud B, Forno G, Mauro L, Kratje R, Oggero M (2017) Glycosylation and antiproliferative activity of hyperglycosylated IFN- $\alpha$ 2 potentiate HEK293 cells as biofactories. *Eur J Pharm Biopharm* 112: 119–131.
- [2] Raniga K, Liang C (2018) Interferons: Reprogramming the metabolic network against viral infection. *Viruses* 10: 1–21.
- [3] Shors T (2009) Capítulo 7 – Resistencia del huésped a las infecciones virales, En: *Virus: Estudio molecular con orientación clínica*, Editorial Médica Panamericana S.A., p. 146–152.
- [4] Wang H, Hu H, Zhang K (2017) Overview of Interferon: Characteristics, signaling and anti-cancer effect. *Arch Biotechnol Biomed* 1: 001–016.
- [5] Wheelock EF (1965) Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science (80-)* 149: 310–311.
- [6] Kotenko S V., Gallagher G, Baurin V V., Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, Langer JA, Sheikh F, Dickensheets H, Donnelly RP (2003) IFN- $\lambda$ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* 4: 69–77.
- [7] Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, Kuestner R, Garrigues U, Birks C, Roraback J, Ostrander C, Dong D, Shin J, Presnell S, Fox B, Haldeman B, Cooper E, Taft D, Gilbert T, Grant FJ, Tackett M, Krivan W, McKnight G, Clegg C, Foster D, Klucher KM (2003) IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol* 4: 63–68.
- [8] O'Brien TR, Prokunina-Olsson L, Donnelly RP (2014) IFN- $\lambda$ 4: The paradoxical new member of the interferon lambda family. *J Interf Cytokine Res* 34: 829–838.
- [9] Lazear HM, Schoggins JW, Diamond MS (2019) Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity* 50: 907–923.
- [10] Moll HP, Maier T, Zommer A, Lavoie T, Brostjan C (2011) The differential activity of interferon- $\alpha$  subtypes is consistent among distinct target genes and cell types. *Cytokine* 53: 52–59.
- [11] Schreiber G (2017) The molecular basis for differential type I interferon signaling. *J Biol Chem* 292: 7285–7294.
- [12] Uzé G, Schreiber G, Piehler J, Pellegrini S (2007) The receptor of the type I interferon family. *Curr Top Microbiol Immunol* 316: 71–95.
- [13] Ceballos A, Sabatté J (2008) Capítulo 3 - Inmunidad innata, En: *Introducción a la Inmunología Humana*, Editorial Médica Panamericana S.A., 362–367.
- [14] Abbas A, Lichtman A, Pillai S (2015) Capítulo 4 – Inmunidad Innata, En *Inmunología celular y molecular*, Elsevier Saunders, p. 51–86.
- [15] Chen K, Liu J, Cao X (2017) Regulation of type I interferon signaling in immunity and inflammation: A comprehensive review. *J Autoimmun* 83: 1–11.
- [16] Goodbourn S, Didcock L, Randall RE (2000) Interferons: Cell signalling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol* 81: 2341–2364.
- [17] McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O'Garra A (2015) Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol* 15: 87–103.
- [18] Zhang KR, Kumar R (1994) Interferon- $\alpha$  Inhibits Cyclin E- and Cyclin D1-Dependent CDK-2 Kinase Activity Associated with RB Protein and E2F in Daudi Cells. *Biochem Biophys Res Commun* 200: 522–528.

- [19] Pestka S, Krause CD, Walter MR (2004) Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological Reviews* 202: 8–32.
- [20] Sotoca Momblona JM (1999) Cuarenta anos de interferones. *Farm Hosp* 23: 205–213.
- [21] George PM, Badiger R, Alazawi W, Graham F, Mitchell JA (2012) Pharmacology and therapeutic potential of interferons. *Pharmacol Ther* 135: 44–53.
- [22] Bekisz J, Schmeisser H, Hernandez J, Goldman ND, Zoon KC (2004) Human interferons alpha, beta and omega. *Growth Factors* 22: 243–251.
- [23] Chen J, Baig E, Fish EN (2004) Diversity and relatedness among the type I interferons. *J Interf Cytokine Res* 24: 687–698.
- [24] Rubinstein M, Rubinstein S, Familletti PC, Miller RS, Waldman AA, Pestka S (1979) Human leukocyte interferon: Production, purification to homogeneity, and initial characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 640–644.
- [25] Goeddel D, Yelverton E, Ullrich A, Heyneker H, Miozzari G, Holmes W, Seeburg P, Dull T, May L, Stebbing N, Crea R, Maeda S, McCandliss R, Sloma A, Tabor JM, Gross M, Familletti PC, Pestka S (1980) Human leukocyte interferon produced in *E. Coli* is biologically active. *Nature* 287: 411–416.
- [26] Zoon K, Millar D, Bekisz J, zur Nedden D, Enterline JC, Nguyen NY, Hu R (1992) Purification and characterization of multiple components of human lymphoblastoid interferon- $\alpha$ . *J Biol Chem* 267: 15210–15216.
- [27] Adolf GR, Kalsner I, Ahorn H, Maurer-fogy I, Cantell K (1991) Natural human interferon- $\alpha$ 2 is O-glycosylated. *Biochem J* 276: 511–518.
- [28] Nyman TA, To H (1998) Identification of nine interferon-alpha subtypes produced by Sendai virus-induced human peripheral blood leucocytes. *Biochem J* 329: 295–302.
- [29] Radhakrishnan R, Walter LJ, Hruza A, Reichert P, Trotta PP, Nagabhushan TL, Walter MR (1996) Zinc mediated dimer of human interferon- $\alpha$ (2b) revealed by X-ray crystallography. *Structure* 4: 1453–1463.
- [30] Klaus W, Gsell B, Labhardt AM, Wipf B, Senn H (1997) The three-dimensional high resolution structure of human interferon  $\alpha$ -2a determined by heteronuclear NMR spectroscopy in solution. *J Mol Biol* 274: 661–675.
- [31] Slutzki M, Jaitin DA, Yehezkel T Ben, Schreiber G (2006) Variations in the Unstructured C-terminal Tail of Interferons Contribute to Differential Receptor Binding and Biological Activity. *J Mol Biol* 360: 1019–1030.
- [32] Runkel L, Pfeffer L, Lewerenz M, Monneron D, Yang CH, Murti A, Pellegrini S, Goelz S, Uzé G, Mogensen K (1998) Differences in activity between  $\alpha$  and  $\beta$  type I interferons explored by mutational analysis. *J Biol Chem* 273: 8003–8008.
- [33] Isaacs A, Lindenmann J (1957) Virus interference. I. The interferon. Ser.B, , . *Proc R Soc London Ser B, Biol Sci* 147: 258–267.
- [34] Bino T, Madar Z, Gertler A, Rosenberg H (1982) The Kidney is the Main Site of Interferon Degradation. *J Interferon Res* 2: 301–308.
- [35] Burdick LM, Somani N, Somani AK (2009) Type I IFNs and their role in the development of autoimmune diseases. *Expert Opin Drug Saf* 8: 459–472.
- [36] Beals JM, Shanafelt AB (2006) Enhancing exposure of protein therapeutics. *Drug Discov Today Technol* 3: 87–94.

- [37] Wang Y, Sen S, Youngster S, Grace M, Bausch J, Bordens R, Wyss DF (2002) Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon alpha-2b and its therapeutic implications. *Adv Drug Deliv Rev* 54: 547–570.
- [38] Jorns C, Holzinger D, Thimme R, Spangenberg HC, Weidmann M, Rasenack J, Blum HE, Haller O, Kochs G (2006) Rapid and simple detection of IFN-neutralizing antibodies in chronic hepatitis C non-responsive to IFN- $\alpha$ . *J Med Virol* 78: 74–82.
- [39] Mufarrege EF, Giorgetti S, Etcheverrigaray M, Terry F, Martin W, De Groot AS (2017) De-immunized and Functional Therapeutic (DeFT) versions of a long lasting recombinant alpha interferon for antiviral therapy. *Clin Immunol* 176: 31–41.
- [40] Montreuil J, Bouquelet S, Debray H, Lemoine J, Michalski J, Spik G, Strecker G (1994) Glycoproteins, En: *Carbohydrate analysis. A practical approach*, (Eds.: Chaplin MF, Kennedy JK), Oxford University Press, New York, EE.UU., 181–293.
- [41] Restelli V, Butler M (2006) The Effect of Cell Culture Parameters on Protein Glycosylation. *Cell Eng* 61–92.
- [42] Ceaglio N, Etcheverrigaray M, Kratje R, Oggero M (2008) Novel long-lasting interferon alpha derivatives designed by glycoengineering. *Biochimie* 90: 437–449.
- [43] Van den Steen P, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G (1998) Concepts and Principles of O-Linked Glycosylation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 33: 151–208.
- [44] Rudd PM, Dwek RA (1997) Glycosylation: Heterogeneity and the 3D Structure of Proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 32: 1–100.
- [45] Sales M de los M, Kratje R, Oggero M, Ceaglio N (2021) Bifunctional GM-CSF-derived peptides as tools for O-glycoengineering and protein tagging. *J Biotechnol* 327: 18–27.
- [46] Tovey MG, Lallemand C (2010) Safety, tolerability, and immunogenicity of interferons. *Pharmaceuticals* 3: 1162–1186.
- [47] Gota C, Calabrese L (2003) Induction of clinical autoimmune disease by therapeutic interferon-alpha. *Autoimmunity* 36: 511–518.
- [48] Oppenheim Y, Ban Y, Tomer Y (2004) Interferon induced Autoimmune Thyroid Disease (AITD): A model for human autoimmunity. *Autoimmun Rev* 3: 388–393.
- [49] Yilmaz S, Akar Cimen K (2009) Pegylated interferon alfa-2B induced lupus in a patient with chronic hepatitis B virus infection: Case report. *Clin Rheumatol* 28: 1241–1243.
- [50] Meyer O (2009) Interferons and autoimmune disorders. *Jt Bone Spine* 76: 464–473.
- [51] Halfon P, Pérusat S, Bourlière M, Bronowicki JP, Trimoulet P, Benhamou Y, Leroy V, Marcellin P, Foucher J, Penaranda G, Chene G (2011) Neutralizing antibodies to interferon- $\alpha$  and circulating interferon in patients with chronic hepatitis C non-responding to pegylated interferon plus ribavirin re-treated by pegylated interferon- $\alpha$ -2a and ribavirin (ANRS HC16 GAMMATRI substudy). *J Med Virol* 82: 2027–2031.
- [52] Scagnolari C, Trombetti S, Soldà A, Milella M, Gaeta GB, Angarano G, Scotto G, Caporaso N, Morisco F, Cozzolongo R, Giannelli G, Fasano M, Santantonio T, Antonelli G (2012) Development and specificities of anti-interferon neutralizing antibodies in patients with chronic hepatitis C treated with pegylated interferon- $\alpha$ . *Clin Microbiol Infect* 18: 1033–1039.
- [53] Schellekens H (2002) Immunogenicity of therapeutic proteins: Clinical implications and future prospects. *Clin Ther* 24: 1720–1740.
- [54] Jawa V, Cousens LP, Awwad M, Wakshull E, Kropshofer H, De Groot AS (2013) T-cell dependent

- immunogenicity of protein therapeutics: Preclinical assessment and mitigation. *Clin Immunol* 149: 534–555.
- [55] De Groot AS, Scott DW (2007) Immunogenicity of protein therapeutics. *Trends Immunol* 28: 482–490.
- [56] Liu GY, Fairchild PJ, Smith RM, Prowle JR, Kioussis D, Wraith DC (1995) Low avidity recognition of self-antigen by T cells permits escape from central tolerance. *Immunity* 3: 407–415.
- [57] Bouneaud C, Kourilsky P, Bousso P (2000) Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: A large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity* 13: 829–840.
- [58] Kyewski B, Derbinski J (2004) Self-representation in the thymus: An extended view. *Nat Rev Immunol* 4: 688–698.
- [59] Antonelli G, Giannelli G, Currenti M, Simeoni E, Del Vecchio S, Maggi F, Pistello M, Roffi L, Pastore G, Chemello L, Dianzani F (1996) Antibodies to interferon (IFN) in hepatitis C patients relapsing while continuing recombinant IFN-alpha2 therapy. *Clin Exp Immunol* 104: 384–387.
- [60] Abbas A, Lichtman A, Pillai S (2015) Capítulo 6 – Moléculas del complejo principal de histocompatibilidad y presentación del antígeno a los linfocitos T, En *Inmunología celular y molecular*, Elsevier Saunders, p. 51–86.
- [61] Chung Y, Chen VSF, Chan PKHT, Lin C-LS (2004) Dendritic cells: sentinels against pathogens N.P.-Y. *Histol Histopathol* 19: 317–324.
- [62] Hasegawa H, Matsumoto T (2018) Mechanisms of tolerance induction by dendritic cells in vivo. *Front Immunol* 9.
- [63] Qian C, Cao X (2018) Dendritic cells in the regulation of immunity and inflammation. *Semin Immunol* 35: 3–11.
- [64] Kubach J, Becker C, Schmitt E, Steinbrink K, Huter E, Tuettenberg A, Jonuleit H (2005) Dendritic cells: Sentinels of immunity and tolerance. *Int J Hematol* 81: 197–203.
- [65] Baker MP, Reynolds HM, Lumicisi B, Bryson CJ (2010) Immunogenicity of protein therapeutics: The key causes, consequences and challenges. *Self/Nonself - Immune Recognit Signal* 1: 314–322.
- [66] Fainboim L, Geffner J (2011) Capítulo 9 - Inmunidad mediada por linfocitos T, En: Introducción a la Inmunología Humana, Editorial Médica Panamericana S.A., p 241-274.
- [67] Weber CA, Mehta PJ, Ardito M, Moise L, Martin B, De Groot AS (2009) T cell epitope: Friend or Foe? Immunogenicity of biologics in context. *Adv Drug Deliv Rev* 61: 965–976.
- [68] De Groot AS, Moise L (2007) Prediction of immunogenicity for therapeutic proteins: State of the art. *Curr Opin Drug Discov Dev* 10: 332–340.
- [69] Tourdot S, Hickling TP (2019) Nonclinical immunogenicity risk assessment of therapeutic proteins. *Bioanalysis* 11: 1631–1643.
- [70] Xue L, Hickling T, Song R, Nowak J, Rup B (2015) Contribution of enhanced engagement of antigen presentation machinery to the clinical immunogenicity of a human interleukin (IL)-21 receptor-blocking therapeutic antibody. *Clin Exp Immunol* 183: 102–113.
- [71] Jaber A, Baker M (2007) Assessment of the immunogenicity of different interferon beta-1a formulations using ex vivo T-cell assays. *J Pharm Biomed Anal* 43: 1256–1261.
- [72] Moise L, Song C, Martin WD, Tassone R, De Groot AS, Scott DW (2012) Effect of HLA DR epitope

- de-immunization of Factor VIII in vitro and in vivo. *Clin Immunol* 142: 320–331.
- [73] De Groot AS, Moise L, Liu R, Gutierrez AH, Tassone R, Bailey-Kellogg C, Martin W (2014) Immune camouflage: Relevance to vaccines and human immunology. *Hum Vaccines Immunother* 10: 3570–3575.
- [74] Asgari S, Ebrahim-Habibi A, Mahdavi M, Choopani M, Mirzahoseini H (2017) Therapeutic protein deimmunization by T-cell epitope removal: antigen-specific immune responses in vitro and in vivo. *Apmis* 125: 544–552.
- [75] Choi Y, Verma D, Griwold KE, Bailey-Kellogg C (2017) EpiSweep: Computationally-driven Reengineering of Therapeutic Proteins to Reduce immunogenicity while Maintaining Function. *Methods Mol Biol* 1529: 375–398.
- [76] Lamberth K, Reedtz-Runge SL, Simon J, Klementyeva K, Pandey GS, Padkjær SB, Pascal V, León IR, Gudme CN, Buus S, Sauna ZE (2017) Post hoc assessment of the immunogenicity of bioengineered factor VIIa demonstrates the use of preclinical tools. *Sci Transl Med* 9: 1–12.
- [77] Mazor R, Vassall AN, Eberle JA, Beers R, Weldon JE, Venzon DJ, Tsang KY, Benhar I, Pastan I (2012) Identification and elimination of an immunodominant T-cell epitope in recombinant immunotoxins based on *Pseudomonas* exotoxin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 3597–3603.
- [78] De Groot AS, Martin W (2009) Reducing risk, improving outcomes: Bioengineering less immunogenic protein therapeutics. *Clin Immunol* 131: 189–201.
- [79] Gokemeijer J, Jawa V, Mitra-Kaushik S (2017) How Close Are We to Profiling Immunogenicity Risk Using In Silico Algorithms and In Vitro Methods?: an Industry Perspective. *AAPS J* 19: 1587–1592.
- [80] Sant'Angelo DB, Robinson E, Janeway CA, Denzin LK (2002) Recognition of core and flanking amino acids of MHC class II-bound peptides by the T cell receptor. *Eur J Immunol* 32: 2510–2520.
- [81] Conant SB, Swanborg RH (2003) MHC class II peptide flanking residues of exogenous antigens influence recognition by autoreactive T cells. *Autoimmun Rev* 2: 8–12.
- [82] O'Brien C, Flower DR, Feighery C (2008) Peptide length significantly influences in vitro affinity for MHC class II molecules. *Immunome Res* 4: 1–7.
- [83] Peters B, Nielsen M, Sette A (2020) T Cell Epitope Predictions. *Annu Rev Immunol* 38: 123–145.
- [84] Hall FC, Rabinowitz JD, Busch R, Visconti KC, Belmares M, Patil NS, Cope AP, Patel S, McConnell HM, Mellins ED, Sonderstrup G (2002) Relationship between kinetic stability and immunogenicity of HLA-DR4/peptide complexes. *Eur J Immunol* 32: 662–670.
- [85] Lazarski CA, Chaves FA, Jenks SA, Wu S, Richards KA, Weaver JM, Sant AJ (2005) The kinetic stability of MHC class II:Peptide complexes is a key parameter that dictates immunodominance. *Immunity* 23: 29–40.
- [86] Kim A, Sadegh-Nasseri S (2016) Determinants of Immunodominance for CD4 T cells. *Physiol Behav* 176: 139–148.
- [87] Gfeller D, Bassani-Sternberg M (2018) Predicting antigen presentation-What could we learn from a million peptides? *Front Immunol* 9: 1–17.
- [88] Wullner D, Zhou L, Bramhall E, Kuck A, Goletz TJ, Swanson S, Chirmule N, Jawa V (2010) Considerations for optimization and validation of an in vitro PBMC derived T cell assay for immunogenicity prediction of biotherapeutics. *Clin Immunol* 137: 5–14.
- [89] Romani N, Gruner S, Brang D, Kämpgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G (1994) Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp*

- Med* 180: 83–93.
- [90] Brinks V, Jiskoot W, Schellekens H (2011) Immunogenicity of therapeutic proteins: The use of animal models. *Pharm Res* 28: 2379–2385.
- [91] Hermeling S, Jiskoot W, Crommelin D, Bornæs C, Schellekens H (2005) Development of a transgenic mouse model immune tolerant for human interferon beta. *Pharm Res* 22: 847–851.
- [92] van Beers MMC, Sauerborn M, Gilli F, Hermeling S, Brinks V, Schellekens H, Jiskoot W (2010) Hybrid transgenic immune tolerant mouse model for assessing the breaking of B cell tolerance by human interferon beta. *J Immunol Methods* 352: 32–37.
- [93] Bessa J, Boeckle S, Beck H, Buckel T, Schlicht S, Ebeling M, Kiialainen A, Koulov A, Boll B, Weiser T, Singer T, Rolink AG, Iglesias A (2015) The immunogenicity of antibody aggregates in a novel transgenic mouse model. *Pharm Res* 32: 2344–2359.
- [94] Filipe V, Jiskoot W, Basmeh AH, Halim A, Schellekens H, Brinks V (2012) Immunogenicity of different stressed IgG monoclonal antibody formulations in immune tolerant transgenic mice. *MAbs* 4: 740–752.
- [95] Lenk C, Unterthurner S, Schuster M, Weiller M, Antoine G, Malisauskas M, Scheifflinger F, Schwarz HP, De La Rosa M, Reipert BM (2013) Development of a transgenic mouse model with immune tolerance for human coagulation factor viia. *Pharm Res* 30: 2855–2867.
- [96] Jiskoot W, Kijanka G, Randolph TW, Carpenter JF, Koulov A V., Mahler HC, Joubert MK, Jawa V, Narhi LO (2016) Mouse Models for Assessing Protein Immunogenicity: Lessons and Challenges. *J Pharm Sci* 105: 1567–1575.
- [97] Abraham RS, David CS (2000) Identification of HLA-class-II-restricted epitopes of autoantigens in transgenic mice. *Curr Opin Immunol* 12: 122–129.
- [98] Taneja V, David CS (1999) HLA class II transgenic mice as models of human diseases. *Immunol Rev* 169: 67–79.
- [99] Taneja V, David CS (1998) HLA transgenic mice as humanized mouse models of disease and immunity. *J Clin Invest* 101: 921–926.
- [100] Li G, De Clercq E (2020) Therapeutic options for the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). *Nat Rev Drug Discov* 19: 149–150.
- [101] Zhou Q, Chen V, Shannon CP, Wei XS, Xiang X, Wang X, Wang ZH, Tebbutt SJ, Kollmann TR, Fish EN (2020) Interferon- $\alpha$ 2b Treatment for COVID-19. *Front Immunol* 11: 1–6.
- [102] Pereda R, González D, Rivero HB, Rivero JC, Pérez A, Lopez LDR, Mezquia N, Venegas R, Betancourt JR, Domínguez RE (2020) Therapeutic Effectiveness of Interferon Alpha 2b Treatment for COVID-19 Patient Recovery. *J Interf Cytokine Res* 40: 578–588.
- [103] Mayer S V., Tesh RB, Vasilakis N (2017) The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. *Acta Trop* 166: 155–163.
- [104] Weaver SC, Charlier C, Vasilakis N, Lecuit M (2018) Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. *Annu Rev Med* 69: 395–408.
- [105] Martinez JD, Garza JAC de la, Cuellar-Barboza A (2019) Going Viral 2019: Zika, Chikungunya, and Dengue. *Dermatol Clin* 37: 95–105.
- [106] Srikiatkachorn A, Mathew A, Rothman AL (2017) Immune-mediated cytokine storm and its role in severe dengue. *Semin Immunopathol* 39: 563–574.
- [107] World Health Organization (2009) Dengue: Guidelines for Diagnoses, Treatment, Prevention and



Control.

- [108] Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T, Wint GRW, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, Hay SI (2013) The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496: 504–507.
- [109] Nunes ML, Carlini CR, Marinowic D, Neto FK, Fiori HH, Scotta MC, Zanella PLÁ, Soder RB, Da Costa JC (2016) Microcephaly and Zika virus: A clinical and epidemiological analysis of the current outbreak in Brazil. *J Pediatr (Rio J)* 92: 230–240.
- [110] Aubry M, Cao-Lormeau V-M (2019) History of arthropod-borne virus infections in French Polynesia. *New Microbes New Infect* 29: 100513.
- [111] Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, Pretrick M, Marfel M, Holzbauer S, Dubray C, Guillaumot L, Griggs A, Bel M, Lambert AJ, Laven J, Kosoy O, Panella A, Biggerstaff BJ, Fischer M, Hayes EB (2009) Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med* 360: 2536–2543.
- [112] Petersen LR, Jamieson DJ, Powers AM, Honein MA (2016) Zika Virus. *N Engl J Med* 374: 1552–1563.
- [113] Powers AM (2017) Vaccine and Therapeutic Options To Control Chikungunya Virus. *Clin Microbiol Rev* 31: 1–29.
- [114] Snyder B, Goebel S, Koide F, Ptak R, Kalkeri R (2018) Synergistic antiviral activity of Sofosbuvir and type-I interferons ( $\alpha$  and  $\beta$ ) against Zika virus. *J Med Virol* 90: 8–12.
- [115] Gowin K, Jain T, Kosiorek H, Tibes R, Camoriano J, Palmer J, Mesa R (2017) Pegylated interferon alpha – 2a is clinically effective and tolerable in myeloproliferative neoplasm patients treated off clinical trial. *Leuk Res* 54: 73–77.
- [116] Furuta Y, Gowen BB, Takahashi K, Shiraki K, Smee DF, Barnard DL (2013) Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. *Antiviral Res* 100: 446–454.
- [117] Pires De Mello CP, Tao X, Kim TH, Bulitta JB, Rodriguez JL, Pomeroy JJ, Brown AN (2018) Zika virus replication is substantially inhibited by novel favipiravir and interferon alpha combination regimens. *Antimicrob Agents Chemother* 62: e01983-17.
- [118] Briolant S, Garin D, Scaramozzino N, Jouan A, Crance JM (2004) In vitro inhibition of Chikungunya and Semliki Forest viruses replication by antiviral compounds: Synergistic effect of interferon- $\alpha$  and ribavirin combination. *Antiviral Res* 61: 111–117.
- [119] Gallegos KM, Drusano GL, D'argenio DZ, Brown AN (2016) Chikungunya Virus: In Vitro Response to Combination Therapy with Ribavirin and Interferon Alfa 2a. *J Infect Dis* 214: 1192–1197.
- [120] Pires De Mello CP, Drusano GL, Rodriguez JL, Kaushik A, Brown AN (2018) Antiviral effects of clinically-relevant interferon- $\alpha$  and Ribavirin regimens against dengue virus in the Hollow Fiber Infection Model (HFIM). *Viruses* 10: 1–12.
- [121] Southwood S, Sidney J, Kondo A, del Guercio MF, Appella E, Hoffman S, Kubo RT, Chesnut RW, Grey HM, Sette A (1998) Several common HLA-DR types share largely overlapping peptide binding repertoires. *J Immunol* 160: 3363–3373.
- [122] De Groot AS (2006) Immunomics: Discovering new targets for vaccines and therapeutics. *Drug Discov Today* 11: 203–209.
- [123] Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36: 59–72.
- [124] Madin SH, Darby NB (1958) Established Kidney Cell Lines of Normal Adult Bovine and Ovine

- Origin. *Proc Soc Exp Biol Med* 98: 574–576.
- [125] Klein E, Klein G, Nadkarni JS, Nadkarni JJ, Wigzell H, Clifford P (1968) Surface IgM-kappa Specificity on a Burkitt Lymphoma Cell In Vivo and in Derived Culture Lines. *Cancer Res* 28: 1300–1310.
- [126] Nadkarni JS, Nadkarni JJ, Clifford P, Manolov G, Fenyö EM, Klein E (1969) Characteristics of new cell lines derived from Burkitt lymphomas. *Cancer* 23: 64–79.
- [127] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Gel electrophoresis of DNA., In: Nolan C (Ed.), *Molecular Cloning. A laboratory Manual*, Nueva York, EE. UU., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1–62.
- [128] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Spectrophotometric determination of the amount of DNA or RNA., En: *Molecular Cloning. A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EE. UU.
- [129] Freshney RI (2000) Cell lines, En: *Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique*, Wiley-Liss Inc., New Jersey, EE. UU., p 177-193.
- [130] Cook JA, Mitchell JB (1989) Viability measurements in mammalian cell systems. *Anal Biochem* 179: 1–7.
- [131] Freshney R (2000) Cryopreservation, En: *Culture of animal cells. A manual of basic technique*, Wiley-Liss Inc., New Jersey, EE. UU., p 297–308.
- [132] Hay RJ (1986) Chapter 4 - Preservation and characterization, En: *Animal cell culture. A practical approach*, (Ed.: Freshney RI) IRL Press, Oxford, Inglaterra, p. 71–112.
- [133] Lovelock JE, Bishop MWH (1959) Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature* 183: 1394–1395.
- [134] Leibo SP, Mazur P (1971) The role of cooling rates in low-temperature preservation. *Cryobiology* 8: 447–452.
- [135] Greene AE, Athreya B, Lehr HB, Coriell LL (1967) Viability of Cell Cultures Following Extended Preservation in Liquid Nitrogen. *Proc Soc Exp Biol Med* 124: 1302–1307.
- [136] Baltimore D (1974) The strategy of RNA viruses. *Harvey Lect* 70: 57–74.
- [137] Esposito D, Craigie R (1999) HIV integrase structure and function. *Adv Virus Res* 52: 319–333.
- [138] Sakuma T, Barry MA, Ikeda Y (2012) Lentiviral vectors: Basic to translational. *Biochem J* 443: 603–618.
- [139] Hirko A, Tang F, Hughes J (2005) Cationic Lipid Vectors for Plasmid DNA Delivery. *Curr Med Chem* 10: 1185–1193.
- [140] Milano F (2001). Tesina de Licenciatura en Biotecnología: Diseño y validación de bioensayos para la valoración biológica in vitro de fármacos. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL. Santa Fe, Argentina.
- [141] Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nat Publ Gr* 227: 680–685.
- [142] Cuatrecasas P, Wilchek M, Anfinsen CB (1968) Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 61: 636–643.
- [143] Ey PL, Prowse SJ, Jenkin CR (1978) Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose. *Mol Immunol* 15: 429–436.

- [144] Mufarrege EF, Haile LA, Etcheverrigaray M, Verthelyi DI (2019) Multiplexed Gene Expression as a Characterization of Bioactivity for Interferon Beta (IFN- $\beta$ ) Biosimilar Candidates: Impact of Innate Immune Response Modulating Impurities (IIRMI). *AAPS J* 21: 1–11.
- [145] Rubinstein S, Familletti PC, Pestka S (1981) Convenient assay for interferons. *J Virol* 37: 755–758.
- [146] Nederman T, Karlström E, Sjödin L (1990) An in vitro bioassay for quantitation of human interferons by measurements of antiproliferative activity on a continuous human lymphoma cell line. *Biologicals* 18: 29–34.
- [147] Julenius K, Mølgaard A, Gupta R, Brunak S (2005) Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology* 15: 153–164.
- [148] Mohl JE, Gerken TA, Leung M-Y (2020) ISOGlyP: de novo prediction of isoform-specific mucin-type O-glycosylation. *Glycobiology*.
- [149] Shargel L, Wu-Pong S, Yu ABC (2005) Chapter 7 - Pharmacokinetics of oral absorption, En: *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics*, McGraw-Hill Medical Publishing Division, Nueva York, EE. UU., p 161–184.
- [150] Gibaldi M, Perrier D (1982) Apéndice C - Method of residuals, En: *Pharmacokinetics*. (Eds.: Gibaldi M, Perrier D), Marcel Dekker, Inc., Nueva York, EE.UU., p 433–444.
- [151] Ackerman SK, Douglas SD (1978) Purification of Human Monocytes on Microexudatecoated Surfaces. *J Immunol* 120: 1372–1374.
- [152] Zuckerman SH, Ackerman SK, Douglas SD (1979) Long-term human peripheral blood monocyte cultures: Establishment, metabolism and morphology of primary human monocyte-macrophage cell cultures. *Immunology* 38: 401–411.
- [153] Jawa V, Terry F, Gokemeijer J, Mitra-Kaushik S, Roberts BJ, Tourdot S, De Groot AS (2020) T-cell dependent immunogenicity of protein therapeutics pre-clinical assessment and mitigation–updated consensus and review 2020. *Front Immunol* 11: 1–23.
- [154] Jones TD, Hanlon M, Smith BJ, Heise CT, Nayee PD, Sanders DA, Hamilton A, Sweet C, Unitt E, Alexander G, Lo K, Gillies SD, Carr FJ, Baker MP (2004) The Development of a Modified Human IFN- $\alpha$ 2b Linked to the Fc Portion of Human IgG1 as a Novel Potential Therapeutic for the Treatment of Hepatitis C Virus Infection. *J Interf Cytokine Res* 24: 560–572.
- [155] Jaks E, Gavutis M, Uzé G, Martal J, Piehler J (2007) Differential Receptor Subunit Affinities of Type I Interferons Govern Differential Signal Activation. *J Mol Biol* 366: 525–539.
- [156] Piehler J, Roisman LC, Schreiber G (2000) New structural and functional aspects of the type I interferon-receptor interaction revealed by comprehensive mutational analysis of the binding interface. *J Biol Chem* 275: 40425–40433.
- [157] Roisman LC, Jaitin DA, Baker DP, Schreiber G (2005) Mutational analysis of the IFNAR1 binding site on IFN $\alpha$ 2 reveals the architecture of a weak ligand-receptor binding-site. *J Mol Biol* 353: 271–281.
- [158] Dhanda SK, Grifoni A, Pham J, Vaughan K, Sidney J, Peters B, Sette A (2018) Development of a strategy and computational application to select candidate protein analogues with reduced HLA binding and immunogenicity. *Immunology* 153: 118–132.
- [159] Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC (1993) Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364: 33–39.
- [160] Büssow K (2015) Stable mammalian producer cell lines for structural biology. *Curr Opin Struct*

- Biol* 32: 81–90.
- [161] Depetris M (2008) Tesis doctoral: Obtención de anticuerpos recombinantes anti-IFN- $\alpha$ 2b destinados a uso terapéutico humano. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL. Santa Fe, Argentina.
- [162] Ceaglio N, Etcheverrigaray M, Conradt HS, Grammel N, Kratje R, Oggero M (2010) Highly glycosylated human alpha interferon: An insight into a new therapeutic candidate. *J Biotechnol* 146: 74–83.
- [163] Gugliotta A (2016) Tesis doctoral: Diseño y optimización de un proceso de producción de muteínas de interferón- $\alpha$ 2b humano con mayor actividad biológica mediante glicosilación en células de mamífero. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL. Santa Fe, Argentina.
- [164] Bennett EP, Mandel U, Clausen H, Gerken TA, Fritz TA, Tabak LA (2012) Control of mucin-type O-glycosylation: A classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Glycobiology* 22: 736–756.
- [165] Ceaglio N, Gugliotta A, Tardivo MB, Cravero D, Etcheverrigaray M, Kratje R, Oggero M (2016) Improvement of in vitro stability and pharmacokinetics of hIFN- $\alpha$  by fusing the carboxyl-terminal peptide of hCG  $\beta$ -subunit. *J Biotechnol* 221: 13–24.
- [166] Paludan SR (1998) Interleukin-4 and Interferon-g: The Quintessence of a Mutual Antagonistic Relationship. *Scand J Immunol* 48: 459–468.
- [167] Casadevall N, Nataf J, Beatrice V, Kolta A, Kiladjian JJ, Martin-Dupont P, Michaud P, Papo T, Ugo V, Teyssandier I, Variet B, Mateux P (2002) Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. *N Engl J Med* 346: 469–475.
- [168] Scagnolari C, Casato M, Bellomi F, De Pisa F, Turriziani O, Coviello R, Pirro MR, Dianzani F, Antonelli G (2003) Serum Interferon (IFN)-Neutralizing Antibodies and Bioactivities of IFNs in Patients with Severe Type II Essential Mixed Cryoglobulinemia. *Clin Diagn Lab Immunol* 10: 70–77.
- [169] Rosenberg AS, Sauna ZE (2018) Immunogenicity assessment during the development of protein therapeutics. *J Pharm Pharmacol* 70: 584–594.
- [170] Lagassé HAD, Alexaki A, Simhadri VL, Katagiri NH, Jankowski W, Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C (2017) Recent advances in (therapeutic protein) drug development. *F1000Research* 6: 113.
- [171] Strohl WR (2015) Fusion Proteins for Half-Life Extension of Biologics as a Strategy to Make Biobetters. *BioDrugs* 29: 215–239.
- [172] Pineda C, Castañeda Hernández G, Jacobs IA, Alvarez DF, Carini C (2016) Assessing the Immunogenicity of Biopharmaceuticals. *BioDrugs* 30: 195–206.
- [173] US Food and Drug Administration (2014) Immunogenicity assessment for therapeutic protein products: guidance for industry, Food and Drug Administration, Rockville, E.E.U.U.
- [174] European Medicines Agency (2017) Guideline on Immunogenicity assessment of therapeutic proteins, Committee for Medicinal Products for Human Use, European Medicines Agency, Londres, Inglaterra.
- [175] Persson E, Kjalke M, Olsen OH (2001) Rational design of coagulation factor VIIa variants with substantially increased intrinsic activity. *Proc Natl Acad Sci* 98: 13583–13588.
- [176] Brophy DF, Martin EJ, Nolte ME, Kuhn JG, Barrett JC, Ezban M (2010) Factor VIIa analog has marked effects on platelet function and clot kinetics in blood from patients with hemophilia A. *Blood Coagul Fibrinolysis* 21: 539–546.

- [177] Ghosh S, Ezban M, Persson E, Pendurthi U, Hedner U, Rao LVM (2007) Activity and regulation of factor VIIa analogs with increased potency at the endothelial cell surface. *J Thromb Haemost* 5: 336–346.
- [178] Persson E, Olsen O, Bjørn S, Ezban M (2012) Vatreptacog Alfa from Conception to Clinical Proof of Concept. *Semin Thromb Hemost* 38: 274–281.
- [179] Mahlangu JN, Weldingh KN, Lentz SR, Kaicker S, Karim FA, Matsushita T, Recht M, Tomczak W, Windyga J, Ehrenforth S, Knobe K (2015) Changes in the amino acid sequence of the recombinant human factor VIIa analog, vatreptacog alfa, are associated with clinical immunogenicity. *J Thromb Haemost* 13: 1989–1998.
- [180] Lentz SR, Ehrenforth S, Abdul Karim F, Matsushita T, Weldingh KN, Windyga J, Mahlangu JN (2014) Recombinant factor VIIa analog in the management of hemophilia with inhibitors: results from a multicenter, randomized, controlled trial of vatreptacog alfa. *J Thromb Haemost* 12: 1244–1253.
- [181] Greenbaum J, Sidney J, Chung J, Brander C, Peters B, Sette A (2011) Functional classification of class II human leukocyte antigen (HLA) molecules reveals seven different supertypes and a surprising degree of repertoire sharing across supertypes. *Immunogenetics* 63: 325–335.
- [182] Sidney J, Steen A, Moore C, Ngo S, Chung J, Peters B, Sette A (2010) Five HLA-DP Molecules Frequently Expressed in the Worldwide Human Population Share a Common HLA Supertypic Binding Specificity. *J Immunol* 184: 2492–2503.
- [183] Sidney J, Steen A, Moore C, Ngo S, Chung J, Peters B, Sette A (2010) Divergent Motifs but Overlapping Binding Repertoires of Six HLA-DQ Molecules Frequently Expressed in the Worldwide Human Population. *J Immunol* 185: 4189–4198.
- [184] Paul S, Lindestam Arlehamn CS, Scriba TJ, Dillon MBC, Oseroff C, Hinz D, McKinney DM, Carrasco Pro S, Sidney J, Peters B, Sette A (2015) Development and validation of a broad scheme for prediction of HLA class II restricted T cell epitopes. *J Immunol Methods* 422: 28–34.
- [185] Shen WJ, Zhang X, Zhang S, Liu C, Cui W (2018) The utility of supertype clustering in prediction for class II MHC-peptide binding. *Molecules* 23: 1–18.
- [186] Piehler J, Thomas C, Garcia KC, Schreiber G (2012) Structural and dynamic determinants of type I interferon receptor assembly and their functional interpretation. *Immunol Rev* 250: 317–334.
- [187] Schubert B, Schärfe C, Dönnies P, Hopf T, Marks D, Kohlbacher O (2018) Population-specific design of de-immunized protein biotherapeutics. *PLoS Comput Biol* 14: 1–19.
- [188] De Groot AS, Terry F, Cousens L, Martin W (2013) Beyond humanization and de-immunization: Tolerization as a method for reducing the immunogenicity of biologics. *Expert Rev Clin Pharmacol* 6: 651–662.
- [189] Ronald S. Oosting (2019) Molecular Biotechnology: From DNA Sequence to Therapeutic Protein, En: *Pharmaceutical Biotechnology*, (Eds.: Crommelin DJA, Sindelar RD, Meibohm B), Springer Nature Switzerland AG, Cham, Suiza, p 1-18.
- [190] Li H, d'Anjou M (2009) Pharmacological significance of glycosylation in therapeutic proteins. *Curr Opin Biotechnol* 20: 678–684.
- [191] Lavoie TB, Kalie E, Crisafulli-Cabatu S, Abramovich R, DiGioia G, Moolchan K, Pestka S, Schreiber G (2011) Binding and activity of all human alpha interferon subtypes. *Cytokine* 56: 282–289.
- [192] Jaitin DA, Roisman LC, Jaks E, Gavutis M, Piehler J, Van der Heyden J, Uze G, Schreiber G (2006) Inquiring into the Differential Action of Interferons (IFNs): an IFN- $\alpha$ 2 Mutant with Enhanced Affinity to IFNAR1 Is Functionally Similar to IFN- $\beta$ . *Mol Cell Biol* 26: 1888–1897.

- [193] Montasser MF, Zaky S, Salaheldin M, Johar D, Abushouk AI, El-Raey F, Al-Husseini M, Mohammed EG (2019) Fib-4 predicts early hematological adverse events induced by interferon-based triple therapy in chronic hepatitis c virus patients. *J Interf Cytokine Res* 39: 85–94.
- [194] Saleh MI, Hindi NN (2018) A population pharmacodynamic model characterizing neutropenia associated with pegylated interferon alpha 2-a therapy in patients with chronic hepatitis C viral infection. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 391: 953–963.
- [195] Butler M (2006) Optimisation of the cellular metabolism of glycosylation for recombinant proteins produced by mammalian cell systems. *Cytotechnology* 50: 57–76.
- [196] Koury MJ (2003) Sugar coating extends half-lives and improves effectiveness of cytokine hormones. *Trends Biotechnol* 21: 462–464.
- [197] Elliott S, Egrie J, Browne J, Lorenzini T, Busse L, Rogers N, Ponting I (2004) Control of rHuEPO biological activity: The role of carbohydrate. *Exp Hematol* 32: 1146–1155.
- [198] Bailon P, Palleroni A, Schaffer CA, Spence CL, Fung WJ, Porter JE, Ehrlich GK, Pan W, Xu ZX, Modi MW, Farid A, Berthold W (2001) Rational design of a potent, long-lasting form of interferon: A 40 kDa branched polyethylene glycol-conjugated interferon  $\alpha$ -2a for the treatment of hepatitis C. *Bioconjug Chem* 12: 195–202.
- [199] Stickler M, Valdes AM, Gebel W, Razo OJ, Faravashi N, Chin R, Rochanayon N, Harding FA (2004) The HLA-DR2 haplotype is associated with an increased proliferative response to the immunodominant CD4+ T-cell epitope in human interferon- $\beta$ . *Genes Immun* 5: 1–7.
- [200] Billiet T, Vande Castele N, Van Stappen T, Princen F, Singh S, Gils A, Ferrante M, Van Assche G, Cleyne I, Vermeire S (2015) Immunogenicity to infliximab is associated with HLA-DRB1. *Gut* 64: 1344–1345.
- [201] Mikk ML, Pfeiffer S, Kiviniemi M, Laine AP, Lempainen J, Härkönen T, Toppari J, Veijola R, Knip M, Ilonen J (2020) HLA-DR-DQ haplotypes and specificity of the initial autoantibody in islet specific autoimmunity. *Pediatr Diabetes* 1218–1226.
- [202] Chen L, Flies DB (2013) Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 13: 227–242.
- [203] Cohen T, Moise L, Ardito M, Martin W, De Groot AS (2010) A method for individualizing the prediction of immunogenicity of protein vaccines and biologic therapeutics: Individualized T cell epitope measure (iTEM). *J Biomed Biotechnol* 2010.
- [204] Link J, Lundkvist Ryner M, Fink K, Hermanrud C, Lima I, Brynedal B, Kockum I, Hillert J, Fogdell-Hahn A (2014) Human Leukocyte Antigen Genes and Interferon Beta Preparations Influence Risk of Developing Neutralizing Anti-Drug Antibodies in Multiple Sclerosis. *PLoS One* 9: e90479.
- [205] Tsang JS, Schwartzberg PL, Kotliarov Y, Biancotto A, Xie Z, Germain RN, Wang E, Olnes MJ, Narayanan M, Golding H, Moir S, Dickler HB, Perl S, Cheung F (2014) Global Analyses of Human Immune Variation Reveal Baseline Predictors of Postvaccination Responses. *Cell* 157: 499–513.
- [206] Kierzek AM, Hickling TP, Figueroa I, Kalvass JC, Nijssen M, Mohan K, Veldman GM, Yamada A, Sayama H, Yokoo S, Gulati A, Dhanikula RS, Gokemeijer J, Leil TA, Thalhauser CJ, Giorgi M, Swat MJ, Chelliah V, Small BG, Benson N, Walker M, Gadkar K, Quarmby V, Deng R, Ferrante A, Dickinson GL, Van Der Walt J, Zhou L, Chen X, Jones HM, Narula J, Tourdot S, Lavé T, Ribba B, van der Graaf PH (2019) A Quantitative Systems Pharmacology Consortium Approach to Managing Immunogenicity of Therapeutic Proteins. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* 8: 773–776.
- [207] Amon R, Reuven EM, Leviatan Ben-Arye S, Padler-Karavani V (2014) Glycans in immune recognition and response. *Carbohydr Res* 389: 115–122.
- [208] Sauna ZE, Lagassé D, Pedras-Vasconcelos J, Golding B, Rosenberg AS (2018) Evaluating and

Mitigating the Immunogenicity of Therapeutic Proteins. *Trends Biotechnol* 36: 1068–1084.