

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Título para la obtención del grado Académico de Doctora en Ciencias Biológicas

**“Estrategia biotecnológica para la producción de
proteínas terapéuticas altamente O-glicosiladas
empleando nuevos péptidos bifuncionales”**

Lic. María Jesús Leopold

Directora de tesis: Dra. Natalia Ceaglio

Codirector de tesis: Dr. Marcos Oggero

Lugar de realización: Laboratorio de Cultivos Celulares

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

Universidad Nacional del Litoral

2025

AGRADECIMIENTOS

Cada paso me enseñó, cada error me construyó. Y en el andar, entendí que los logros solo tienen sentido si se comparten con quienes los hicieron posibles...

Este trabajo es el resultado de muchos esfuerzos compartidos. Agradezco profundamente a quienes me acompañaron, guiaron y alentaron en cada etapa de este recorrido. Su apoyo, confianza y compañía hicieron posible que esta tesis hoy sea una realidad.

¡GRACIAS ETERNAS!

A la tan preciada Universidad Nacional del Litoral por brindar los recursos que hicieron posible el desarrollo de este trabajo y especialmente a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas por haber sido mi hogar durante tantos años, aportando el espacio y las herramientas que permitieron mi crecimiento personal y profesional. A todo el personal docente, no docente y directivos, gracias también por toda la paciencia y la ayuda brindada durante todo este tiempo. Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por otorgarme una beca que hizo posible este doctorado, apostando a mi formación y permitiendo que me dedique de lleno a este trabajo que tanto disfruté.

A los miembros del jurado, por el tiempo y la dedicación destinados a la lectura y evaluación de este trabajo.

Al Centro Biotecnológico del Litoral, por abrirme sus puertas, ofrecerme un lugar para concretar este proyecto y permitirme crecer. A Marina y Ricardo, mi agradecimiento eterno por darme la oportunidad de formar parte de este grupo extraordinario. A Claudio, gracias por darme la posibilidad de seguir formando parte de este grupo y trabajar en este maravilloso lugar.

Quiero agradecer especialmente a mis directores Natalia y Marcos, por guiarme, acompañarme y sostenerme durante este camino, aportando al desarrollo de esta tesis y compartiendo su valeroso conocimiento. Gracias por la confianza depositada en mí y por su infinita paciencia. Todo lo aprendido con ustedes lo llevo conmigo como una de las cosas más valiosas de este tiempo junto con el placer de haber compartido tantos años juntos.

A Nati, ¡doblemente gracias! Por el apoyo constante, por compartir tu confianza, y por estar siempre dispuesta a escuchar. Gracias por tu cercanía, tu enorme calidez y por acompañar siempre con tanta empatía. Realmente me siento afortunada de haber compartido mi doctorado con una persona tan capaz y tan generosa.

A todos los que forman parte del CBL y Biotecnofe por ser excelentes compañeros y estar dispuestos siempre a brindar apoyo y colaboración. Gracias por sus aportes tan valiosos que sin dudas forman parte de este trabajo de tesis. Gracias a Franche, mi primera pasante, por su gran contribución a este trabajo y por permitirme dirigir y guiar su proyecto. También a todo

el personal de Zelltek por toda la ayuda recibida a lo largo de este tiempo, por su buena predisposición y constante colaboración.

Un agradecimiento super especial al Doc por compartir su enorme experiencia siempre con una sonrisa, porque entre charlas y anécdotas, las tardes pasaron volando. ¡Gracias por estar siempre dispuesto a dar una mano!

A todos los amigos que hice en este hermoso lugar, a los que ya se fueron, Juani, Vicky, Sofi, Fer, Anto, Soni, Juli L., Erne y Batta que formaron parte de un período hermoso de crecimiento y formación. A los que todavía quedamos, Javi, Fran, Copi, Delfi, Flor, Juli P., Male y Lu, por su acompañamiento en este recorrido y por ir mano a mano avanzando en este proceso. Gracias a todos por escuchar, por sus consejos, por las charlas y las miles de juntadas que siempre va a formar parte de mí. ¡Gracias por el tiempo compartido y por hacer que todo cueste un poco menos! Sin dudas no hubiera sido lo mismo sin alguno de ustedes.

Un gracias aparte a Javi por toda la ayuda y el aguante, tratando de que las tesis avancen. Toda la estadística aplicada en este trabajo es parte de la magia de mi amigo, gracias por tanto!!

A mi amigo personal Fede, gracias por las miles de charlas, desahogos y confianza. Me alegra mucho saber que seguís ahí sin importar las distancias ni los momentos de cada uno. Gracias siempre por tu amistad.

A las amigas que la facu me dio, Cami, Maru y Virgi, porque son únicas y con ustedes cualquier charla tiene lugar, haciendo los descargos del momento. Gracias por los miles de audios para “ponernos al día” y actualizar los estados de cada una, por entender y apoyar, porque aunque el cuelgue sea la característica sabemos que estamos siempre.

A mis amigas de toda la vida, Debi, Andrei, Delvi, Rochu y Vero, por ser parte fundamental de mi mundo. Gracias por festejar mis logros, acompañar en las malas y apoyar en la que sea. Amo que nuestra amistad siga intacta desde hace ya 30 años y que nos conozcamos tanto que ya sabemos lo que cada una piensa. ¡Celebro su amistad y brindo para que sean muchos años más compartiendo todo!

A luli hoper, Nori y Miguel por recibirme con los brazos abiertos y siempre estar dispuestos a dar una mano! Muchas gracias por dejarme formar parte de su familia!

Al lautí, mi compañero de vida, por apoyar hasta en lo que no está de acuerdo, porque, aunque no entienda mucho mis manejos se mantuvo siempre firme ahí, dispuesto a bancar. Gracias por enseñarme tantas cosas que desconocía y por darme un lugar al que llamar hogar.

A mi familia que amo con toda mi alma. Recuerdo la última vez que escribí algo así y veo ahora lo mucho que creció y me llena de felicidad. Gracias a las mejores hermanas del mundo, Natu y Dani, porque hoy todo lo que soy se los debo en gran parte a ustedes. ¡Gracias por haberme acompañado siempre, por preocuparse por mi, por brindarme su apoyo y acompañarme a cada paso que doy, viviendo mis alegrías como propias! Realmente me

siento muy afortunada de poder contar siempre con ustedes. A mis cuñias, Atu y Diego, por bancarme siempre, compartir miles de momentos y ayudarme cada vez que lo necesito. La verdad son una masa y agradezco que formen parte de esta familia. A mis sobrinos pequeños Luisi, Justi y Loli, que me llenan el alma con su ternura y amor. Gracias por ser nuestros chiquis y alegrarnos la vida.

A mi papa, el gordi, ¡miles de cosas por las cuales agradecerte! Gracias por estar siempre pendiente y ayudando en lo que sea, por construir esta hermosa familia y fomentar siempre el vínculo entre nosotras. Gracias por salir adelante cada vez que la vida te puso a prueba, transmitiéndonos tu fuerza y tu voluntad. Gracias por inculcarnos miles de valores y transmitirnos tantas enseñanzas. Todo lo que soy hoy te lo debo a vos y espero algún día ser, al menos, un poquito de todo lo que sos. Este logro es por y para vos!

A mi ma, porque *el tiempo pasó, pero tu lugar sigue intacto*. Gracias porque me seguís cuidando y guiando desde donde estés. Porque sos el ejemplo de mujer que siempre voy a admirar y aspirar a ser. Ojalá algún día pueda honrarte siendo un poco de lo que fuiste. Te llevo siempre conmigo, porque *no te fuiste de mi vida, solo cambiaste la forma de estar*.

Finalmente, agradezco a Dios, por permitirme llegar a este momento, por acomodar las cosas, abrir caminos y rodearme de personas tan hermosas. Este viaje no solo fue trabajo, sino también una forma de crecer, *porque entendí que no hay final si uno sigue aprendiendo. Que todo cierre es también un comienzo, y que lo vivido vale por lo compartido*.



Jesue

APORTES CIENTÍFICOS-TECNOLÓGICOS

Innovative Multifunctional Tag System for Protein Purification and Analytical Characterization, María Jesús Leopold, Verónica Ferrando, Ricardo Kratje, Marcos Oggero and Natalia Ceaglio. J. Chromatogr. B. ISSN1570-0232 (2025); 1267: 124811. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2025.124811>

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	1
APORTES CIENTÍFICOS-TECNOLÓGICOS	4
ÍNDICE	5
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	13
1. ABREVIATURAS Y SIGLAS	13
2. SÍMBOLOS	19
3. UNIDADES.....	21
4. CÓDIGO DE UNA Y TRES LETRAS PARA AMINOÁCIDOS	22
5. NOMENCLATURA DE AZÚCARES	23
RESUMEN	24
SUMMARY	27
INTRODUCCIÓN	31
1. DESARROLLO DE PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS	31
1.1. Tipos de proteínas terapéuticas	32
2. DESAFÍOS EN LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS	33
2.1. Complejidad estructural.....	33
2.2. Proceso de obtención.....	33
2.3. Limitaciones farmacológicas y clínicas	34
2.3.1. Eliminación de las proteínas terapéuticas	35
3. ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LAS PROPIEDADES DE BIOTERAPÉUTICOS	37
3.1. Glicoingeniería	40
3.1.1. Glicosilación	41
3.1.1.1. Tipo y estructura de oligosacáricos	41
3.1.1.1.1. N-glicosilación	42
3.1.1.1.2. O-glicosilación	43
3.1.1.2. Rol biológico de la glicosilación e impacto sobre las propiedades de las proteínas terapéuticas	45
3.1.1.2.1. Efecto sobre estabilidad y solubilidad	45
3.1.1.2.2. Efecto sobre la actividad biológica.....	46
3.1.1.2.3. Efecto sobre la antigenicidad e inmunogenicidad	47
3.1.1.2.4. Efectos sobre farmacocinética y farmacodinamia	48
3.1.2. Estrategias de glicoingeniería	49
3.1.3. Factores que influyen sobre la glicosilación	52
4. ESTRATEGIAS PARA LA PURIFICACIÓN DE BIOTERAPÉUTICOS.....	54
4.1. Uso de etiquetas como sistemas de afinidad	56

4.1.1.	Uso de etiquetas con epitopes peptídicos o <i>epitope tagging</i>	57
4.1.2.	Sistemas de elución	59
5.	BIOTERAPÉUTICOS COMO PROTEÍNAS MODELO.....	59
5.1.	Interferón como proteína modelo.....	60
5.1.1.	Tipo de Interferones	60
5.1.1.1.	IFN- α	62
5.1.1.2.	Estructura del hIFN- α	63
5.1.2.	Actividad biológica del hIFN- α	64
5.1.3.	Uso clínico y comercial.....	65
5.2.	Eritropoyetina como proteína modelo	66
5.2.1.	Estructura de hEPO	66
5.2.2.	Actividad biológica de hEPO	68
5.2.3.	Uso clínico y comercial.....	68
6.	DESARROLLO DE LAS ETIQUETAS GMOP Y mGMOP	70
6.1.	Diseño de proteínas de fusión con las etiquetas GMOP y mGMOP	71
	OBJETIVOS.....	76
	MATERIALES Y MÉTODOS.....	78
1.	REACTIVOS Y SOLUCIONES	78
2.	BIOLOGÍA MOLECULAR.....	78
2.1.	Línea celular procariota.....	78
2.2.	Medios de cultivo para células procariotas	78
2.3.	Diseño y construcción de las proteínas de fusión.....	78
2.3.1.	Diseño <i>in silico</i> de variantes de hIFN- α 2b	78
2.3.2.	Diseño <i>in silico</i> de variantes de hEPO.....	79
2.4.	Vectores Plasmídicos.....	80
2.4.1.	Vectores pUC y pMA-T	80
2.4.2.	Vectores pLV-pLK	80
3.	TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	81
3.1.	Reactivos para técnicas de biología molecular.....	81
3.2.	Preparación de células competentes por método químico	81
3.3.	Transformación de células competentes	82
3.4.	Criopreservación de cepas bacterianas.....	83
3.5.	Revitalización de cepas bacterianas	83
3.6.	Preparación de ADN plasmídico	83
3.6.1.	Minipreparación de ADN plasmídico	83
3.6.2.	Maxipreparación de ADN plasmídico	84
3.7.	Determinación de la concentración y la pureza del ADN	85

3.8.	Digestiones enzimáticas.....	86
3.9.	Electroforesis en gel de agarosa	86
3.10.	Precipitación del ADN	87
3.11.	Purificación del ADN a partir de geles de agarosa	87
3.12.	Reacción de ligación de ADN.....	88
3.13.	Secuenciación del ADN plasmídico.....	88
4.	CULTIVOS DE CÉLULAS DE MAMÍFERO	88
4.1.	Líneas celulares	88
4.2.	Cepa viral.....	90
4.3.	Medios de cultivo para células eucariotas	90
4.4.	Soluciones y Suplementos	91
5.	TÉCNICAS DE CULTIVOS CELULARES	92
5.1.	Sistemas de cultivo de células eucariotas	92
5.1.1.	Cultivos en adherencia.....	92
5.1.2.	Cultivos en suspensión	92
5.2.	Subcultivos en adherencia	92
5.3.	Subcultivos en suspensión.....	93
5.4.	Determinación de la concentración y la viabilidad celular.....	93
5.5.	Criopreservación de las líneas celulares de mamífero	94
5.6.	Revitalización de las líneas celulares de mamífero	95
5.7.	Preparación de una capa de células alimentadoras (<i>feeder layer</i>)	95
5.8.	Desarrollo de líneas celulares recombinantes	96
5.8.1.	Ensamblado de partículas lentivirales	96
5.8.1.1.	Vectores lentivirales empaquetadores.....	96
5.8.2.	Metodología de ensamblado	97
5.8.3.	Evaluación funcional de las PLs mediante expresión de GFP	99
5.8.4.	Transducción de células de mamífero con PLs	99
5.8.5.	Selección de células recombinantes	100
5.8.6.	Adaptación de las células a crecimiento en suspensión	101
5.8.7.	Evaluación de la productividad específica.....	102
5.8.8.	Producción de proteínas recombinantes	103
6.	OBTENCIÓN DE REACTIVOS PARA PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS.....	103
6.1.	mAb CC1H7	103
6.1.1.	Adaptación del hibridoma productor del mAb	103
6.1.2.	Producción del mAb	104
6.1.3.	Titulación del mAb mediante ELISA específico indirecto	104
6.1.4.	Cuantificación del mAb mediante ELISA sándwich.....	105

6.1.5.	Purificación del mAb por cromatografía de afinidad a proteína A	106
6.1.6.	Determinación de la concentración del mAb purificado	108
6.1.7.	Determinación de la pureza mediante SDS-PAGE	108
6.2.	mAb CA5E6	109
6.3.	mAb 2B2	109
7.	PUESTA A PUNTO DEL SISTEMA mGMOP-mAb CC1H7	109
7.1.	Desarrollo de una cromatografía de inmunoafinidad (CIA)	110
7.1.1.	Preparación de la matriz: inmovilización del mAb CC1H7 a una resina de <i>Sepharose</i> activada con bromuro de cianógeno (CNBr).....	110
7.1.2.	Optimización de las condiciones de unión.....	111
7.1.2.1.	Selección de sales y evaluación de su influencia sobre la interacción mAb CC1H7-mGMOP	111
7.1.2.2.	Optimización de las condiciones de unión mediante diseño de experimentos (DoE).....	112
7.1.2.3.	Capacidad dinámica.....	112
7.1.2.4.	Determinación de la constante de afinidad (K_A) del mAb CC1H7 en las condiciones definidas	113
7.1.3.	Optimización de las condiciones de elución	114
7.1.3.1.	Estabilidad del mAb CC1H7 frente a potenciales soluciones de elución..	114
7.1.3.2.	Análisis del poder de elución de diferentes soluciones	115
7.1.4.	Purificación de las variantes por CIA empleando la resina mAb CC1H7- <i>Sepharose</i>	115
7.2.	Diseño y optimización de un ELISA de competición	116
7.3.	Evaluación del mAb CC1H7 como herramienta de detección.....	119
8.	OBTENCIÓN DE LOTES DE QUIMERAS DE rhIFN Y rhEPO	121
8.1.	Purificación de las variantes de rhIFN y rhEPO mediante CIA empleando la matriz mAb CC1H7- <i>Sepharose</i>	121
8.2.	Purificación de las variantes de rhIFN mediante CIA empleando la matriz mAb CA5E6- <i>Sepharose</i>	121
8.3.	Cuantificación de las variantes de rhIFN y rhEPO por ELISA.....	122
8.3.1.	ELISA sándwich para rhIFN	122
8.3.2.	ELISA sándwich para rhEPO	123
8.3.3.	ELISA sándwich para rhEPO modificado	124
8.4.	Concentración y diafiltración de las fracciones purificadas de rhIFN y rhEPO	124
8.5.	Determinación de la concentración de las variantes de rhIFN y rhEPO purificadas... ..	124
8.6.	Evaluación de la pureza de las proteínas	125

8.6.1.	Análisis por SDS-PAGE	125
8.6.2.	Análisis cromatográfico	125
9.	CARACTERIZACIÓN DE LAS VARIANTES DE rhIFN Y rhEPO PURIFICADAS	126
9.1.	Caracterización analítica y análisis de glicofomas.....	126
9.1.1.	SDS-PAGE y <i>Western blot</i>	126
9.1.2.	Isoelectroenfoque (IEF).....	126
9.1.3.	Deglicosilación	126
9.1.4.	Análisis del contenido de ácido siálico.....	127
9.2.	Caracterización conformacional de las proteínas	128
9.2.1.	Dicroísmo Circular.....	128
9.2.2.	<i>Thermal Shift Assay</i>	129
9.3.	Caracterización biológica	129
9.3.1.	Actividad biológica <i>in vitro</i>	129
9.3.1.1.	Actividad biológica antiviral (AAV) <i>in vitro</i> de rhIFN	129
9.3.1.2.	Actividad biológica antiproliferativa (AAP) <i>in vitro</i> de rhIFN	131
9.3.1.3.	Actividad biológica eritropoyética <i>in vitro</i> de rhEPO.....	132
9.3.2.	Análisis de estabilidad.....	133
9.3.2.1.	Estabilidad en plasma humano.....	133
9.3.2.2.	Estabilidad térmica	134
9.3.3.	Farmacocinética.....	134
9.3.3.1.	Metodología experimental empleada para las variantes de rhIFN	134
9.3.3.2.	Metodología experimental empleada para las variantes de rhEPO.....	135
9.3.3.3.	Modelo de un compartimento con cinética de absorción y eliminación de primer orden	135
9.3.3.4.	Modelo de un compartimento con compartimentos de tránsito y cinética de absorción y eliminación de primer orden.....	138
9.3.3.5.	Estimación de los parámetros poblacionales, individuales y evaluación de la calidad de los modelos.....	141
9.4.	Actividad antitumoral <i>in vivo</i> de rhIFN	141
9.5.	Actividad eritropoyética <i>in vivo</i> de rhEPO.....	143
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	145
1.	EVALUACIÓN DEL SISTEMA DE AFINIDAD mGMOP-mAb CC1H7.....	146
1.1.	Obtención del mAb CC1H7	146
1.1.1.	Adaptación a suspensión y análisis de productividad	146
1.1.2.	Producción <i>in vitro</i> del mAb CC1H7 en las condiciones de adaptación	148
1.1.3.	Purificación del mAb CC1H7 por cromatografía de afinidad a proteína A....	148

1.2.	Evaluación del sistema mGMOP-mAb CC1H7 como herramienta para la purificación de proteínas de fusión: optimización de una CIA	150
1.2.1.	Preparación de matrices de IAF mediante inmovilización del mAb CC1H7	150
1.2.2.	Optimización de las condiciones de unión mGMOP-mAb CC1H7	151
1.2.2.1.	Selección del tipo de sal, rango de concentraciones y pH	151
1.2.2.2.	Determinación de las condiciones óptimas de unión entre mGMOP-mAb CC1H7 mediante DoE	153
1.2.2.3.	Determinación de la DBC para cada condición salina	155
1.2.2.4.	Determinación de las K_A para la interacción mGMOP-mAb CC1H7 bajo diferentes condiciones	158
1.2.3.	Optimización de las condiciones de elución	160
1.2.3.1.	Estabilidad del mAb CC1H7 en posibles soluciones de elución.....	161
1.2.3.2.	Determinación de las condiciones de elución de las proteínas etiquetadas con mGMOP a partir de la matriz mAb CC1H7- <i>Sepharose</i>	162
1.2.4.	Protocolo optimizado de purificación mediante CIA. Determinación de parámetros cromatográficos	163
1.3.	Empleo del sistema mGMOP-mAb CC1H7 para la cuantificación y detección de proteínas de fusión	167
1.3.1.	Desarrollo de un método de cuantificación: ELISA de competición	167
1.3.1.1.	Selección de factores y evaluación preliminar	167
1.3.1.2.	Determinación de las condiciones óptimas del ELISA de competición mediante DoE.....	170
1.3.1.3.	Validación del método	172
1.3.2.	Desarrollo de un método de detección: <i>western blot</i>	174
2.	ESTUDIO DE LAS ETIQUETAS GMOP Y mGMOP FUSIONADAS A hIFN EN CONDICIONES DE HIPER-O-GLICOSILACIÓN.....	176
2.1.	Generación de muteínas de fusión hiper-O-glicosiladas de hIFN	176
2.1.1.	Diseño de las variantes y análisis <i>in silico</i> de los sitios potenciales de O-glicosilación.....	176
2.1.2.	Desarrollo de líneas celulares productoras de las variantes de rhIFN	180
2.1.2.1.	Construcción de vectores de expresión para células eucariotas.....	180
2.1.2.2.	Producción de vectores lentivirales	181
2.1.2.3.	Generación de líneas celulares	181
2.1.2.4.	Selección de líneas celulares productoras.....	183
2.1.2.5.	Adaptación al crecimiento en suspensión.....	186
2.1.2.6.	Producción de las variantes de interés	187
2.2.	Purificación de las variantes de interés mediante CIA.....	187

2.2.1.	Purificación por CIA con mAb CC1H7	187
2.2.2.	Purificación por CIA con mAb anti-hIFN- α 2b CA5E6	191
2.2.3.	Comparación de los procesos cromatográficos	195
2.3.	Caracterización de las variantes de rhIFN.....	196
2.3.1.	Caracterización analítica – Análisis de glicofomas	196
2.3.1.1.	SDS-PAGE/ <i>Western blot</i>	196
2.3.1.2.	O-deglicosilación	198
2.3.1.3.	IEF	199
2.3.1.4.	Evaluación del contenido de ácido siálico.....	201
2.3.2.	Estudio de la estructura tridimensional.....	203
2.3.2.1.	Dicroísmo circular	203
2.3.2.2.	<i>Thermal Shift Assay</i>	205
2.3.3.	Determinación de la actividad biológica <i>in vitro</i>	207
2.3.3.1.	Actividad antiviral <i>in vitro</i>	208
2.3.3.2.	Actividad antiproliferativa <i>in vitro</i>	212
2.3.3.3.	Estabilidad plasmática.....	216
2.3.3.4.	Estabilidad térmica	218
2.3.4.	Farmacocinética en animales de experimentación	220
2.3.5.	Actividad antitumoral <i>in vivo</i>	224
3.	VALIDACIÓN DE BIFUNCIONALIDAD DE LAS ETIQUETAS GMOP Y mGMOP EN rhEPO	231
3.1.	Generación de muteínas de fusión hiper-O-glicosiladas de rhEPO	231
3.1.1.	Diseño de las variantes y análisis <i>in silico</i> de los sitios potenciales de O-glicosilación.....	231
3.1.2.	Desarrollo de líneas celulares productoras de las variantes de rhEPO.....	234
3.1.2.1.	Construcción de vectores de expresión para células eucariotas y ensamblado de partículas lentivirales	234
3.1.2.2.	Generación de líneas celulares	234
3.1.2.3.	Selección de líneas celulares productoras.....	236
3.1.2.4.	Adaptación al crecimiento en suspensión.....	238
3.1.2.5.	Producción de las variantes de interés	238
3.2.	Validación del sistema de afinidad GMOP/mGMOP-mAb CC1H7 en las muteínas de fusión de rhEPO	238
3.2.1.	Purificación de las variantes de rhEPO mediante CIA empleando el mAb CC1H7	238
3.2.2.	Empleo del sistema mGMOP-mAb CC1H7 para la cuantificación y detección de las variantes de fusión de rhEPO	242

3.2.2.1. ELISA de competición	242
3.2.2.2. <i>Western blot</i>	244
3.3. Validación de la funcionalidad biológica de las etiquetas GMOP y mGMOP en rhEPO.....	246
3.3.1. Caracterización analítica	246
3.3.1.1. Deglicosilación de las variantes de rhEPO	246
3.3.1.2. Isoelectroenfoque	248
3.3.1.3. Dicroísmo circular	249
3.3.1.4. <i>Thermal shift assay</i>	252
3.3.2. Caracterización biológica <i>in vitro</i>	253
3.3.2.1. Actividad biológica eritropoyética <i>in vitro</i>	253
3.3.2.2. Estabilidad plasmática	255
3.3.3. Farmacocinética en animales de experimentación	256
3.3.4. Actividad biológica <i>in vivo</i>	259
CONCLUSIONES	262
BIBLIOGRAFÍA	269

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

1. ABREVIATURAS Y SIGLAS

AAV	Actividad antiviral
AAP	Actividad antiproliferativa
AB	Actividad biológica
ABAC	Asociación banco argentina de células
ABE	Actividad biológica específica
Ac	Anticuerpo
ADC	Conjugados anticuerpos-fármaco
ADN	Ácido desoxiribonucleico
AIC	Criterio de información de Akaike
AmpR	Resistencia a ampicilina
ANOVA	Análisis de la varianza
AOF	<i>Animal-origin-free</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
ASGPR	Receptores de asialoglicoproteínas
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BBD	<i>Box Behnken Design</i>
BDF	<i>Backward differentiation formula</i>
BHK	<i>Baby Hamster kidney cell</i>
BIC	Criterio de información bayesiano
BICc	Criterio de información bayesiano corregido
BLS	<i>Bilinear Least Squares</i> (regresión de mínimos cuadrados bilineal).
BSA	Albúmina sérica bovina
CaM	Calmodulina
CBP	<i>Calmodulin-binding peptide</i>
CCDA	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
CD BHK PM	<i>CD BHK Production médium</i>
CEPO	Eritripoyetina carbamilada
CERA	Activador continuo del receptor de EPO
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CIA	Cromatografía de inmunoafinidad
CIP	<i>Cleaning in place</i>
CMC	Centro de Medicina Comparada

CMV	Citomegalovirus
Col.	Colaboradores
CQA	<i>Critical Quality Attributes</i>
cPPT	<i>Central Polypurine Tract</i>
CSF	Factor estimulante de colonias
CS	Con sal
CTP	<i>Carboxy-terminal Peptide</i>
DBC	<i>Dynamic binding capacity</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMEM/F'12	<i>DMEM/Nutrient Mixture F-12</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DoE	Diseño de experimentos
DSMZ	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
EJCR	Elíptica de la Región de Confianza Conjunta (<i>Joint Confidence Region ellipse</i>)
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EPO	Eritropoyetina
EPOR	Receptor de EPO
ES	ELISA sándwich
EVP	<i>Enhancement value product</i>
Fc	Fragmento constante de las inmunoglobulinas
FcRn	Receptor que promueve reciclaje intracelular
FCDA	Fagocitosis celular dependiente de anticuerpos
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fig.	Figura
FIM	Matriz de información de Fisher
FMF	Fiebre mediterránea familiar
FSH	Hormona foliculoestimulante
FSM	<i>Free Style Max</i>
FT	<i>Flowthrough</i>
FVII	Factor VIII
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
GDP	Guanosín difosfato

GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GI	Tracto gastrointestinal
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos
GMOP	<i>GM-CSF O-glycosylated Peptide</i>
GPI	Anclaje glicosilfosfatidilinositol
GTs	Glicosiltransferasas
GST	<i>Glutathione S-Transferase</i>
HBV	Virus de la Hepatitis B
hCBG	Globulina de unión a corticoides humana
hCG	Gonadotropina coriónica humana
HCV	Virus de la Hepatitis C
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
hEPO	Eritropoyetina humana
hFSH	Hormona folículo estimulante humana
hGH	Hormona de crecimiento humano
hGM-CSF	Factor estimulante de colonia de macrófagos y granulocitos humano
HIF	Factor inducible por hipoxia
hIFN	Interferón humano
HIV	Virus de inmunodeficiencia humana
HPAEC-PAD	Cromatografía de intercambio aniónico de alta performance con detección de pulso amperométrico
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HSA	Albúmina sérica bovina
IA	Inteligencia Artificial
IAF	Inmunofinidad
ICH	<i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>
ICIVet	Instituto de Ciencias Veterinarias
Ig	Inmunoglobulina
IgG	Inmunoglobulina G
IEF	Isoelectroenfoque
IFN	Interferón
IFN-NG	Interferón no glicosilado
IFN-wt	Interferón <i>wild type</i>
IL	Interleuquina
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>

ISAL	Instituto de Salud y Ambiente
IVIG	Inmunoglobulina intravenosa
IVGE	<i>In Vitro GlycoEngineering</i>
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
LTRs	<i>Long terminal repeats</i>
LVs	Lentivirus
mAb	Anticuerpo monoclonal
mAbs	Anticuerpos monoclonales
MBP	<i>Maltose Binding Protein</i>
MCMC	<i>Markiv Chain Monte Carlo</i>
MDBK	<i>Madin-Darby Bovine Kidney</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
mGMOP	<i>Modified GM-CSF O-glycosylated Peptide</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MM	Masa molecular
MMM	Marcador de masa molecular
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxi-fenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium
MW	<i>Multiwell</i>
MyM	Materiales y Métodos
NESP	<i>Novel Erythropoiesis Stimulating Protein</i>
NIBSC	<i>National Institute for Biological Standards and Control</i>
NLME	<i>Nonlinear mixed-effects model</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPD	O-fenilendiamina
ORI	Origen de replicación
pAb	Anticuerpo policlonal
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBS	<i>Primer Binding Site</i>
PC-3	Línea celular humana establecida de un adenocarcinoma de próstata
PEG	Polietilenglicol
PK	Farmacocinética
PD	Farmacodinamia
pl	Punto isoeléctrico

PLs	Partículas lentivirales
PLABEM	Plataforma Argentina de Biología Estructural y Metabólica
PM	<i>Production Medium</i>
PMS	Metasulfato de fenazina
PTMs	<i>Post-translational modifications</i>
PS	Péptido señal
PVDF	Difluoruro de polivinilo
RE	Retículo endoplasmático
Rev	Proteína lentiviral Rev
RF	Ruido de fondo
rhEPO	Eritropoyetina humana recombinante
rhIFN	Interferón humano recombinante
RMS	Superficie de respuesta
ROIs	Regiones de interés
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium,</i>
RRE	<i>Rev Response Element</i>
RyD	Resultado y Discusión
SAEM	<i>Stochastic Approximation Expectation Maximization</i>
SAFC	<i>Serum Free Medium</i>
sCHO	<i>Suspension Chinese Hamster Ovary</i>
SE	Solución ensayada
SEN	Sensibilidad
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero Fetal Bovino
SFM	Medio libre de suero
SPF	<i>Specific Pathogen Free</i>
SS	Sin sal
SV40	Virus de simio 40
TA	Temperatura ambiente
TAE	Solución de Tris-acetato-EDTA
TAP	<i>Tandem affinity purification</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
Td	Transducción
TFF	Filtración por flujo tangencial
TGF	Factor de crecimiento transformante
TNF	Factor de necrosis tumoral

Tris	Tris-(hidroximetil)-aminoetano
Tween 20	Polisorbato 20
UAA	<i>Unmodified aminoacid</i>
UDP	Uridina difosfato
UE	Unión europea
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
UV	Ultravioleta
VC	Volumen de columna
Vis	Visible
VSV	Virus de la estomatitis vesicular
WPRE	Elemento regulatorio postranscripcional del virus de la hepatitis de <i>Woodchuck</i>
wt	<i>Wild type</i>

2. SÍMBOLOS

%R	Porcentaje de recuperación
a	Absortividad
a_n	Compartimento de tránsito n
A	Pendiente de la recta de calibrado
A_b	Absorbancia del blanco
A_m	Absorbancia de la muestra
AUC	Área bajo la curva
C	Concentración de IFN en cada fracción de FT
C_i	Concentración inicial de células
C_0	Concentración de IFN en la muestra sembrada
CE50	Concentración efectiva que produce el 50% de unión
Cél.	Células
C_f	Concentración final de células
Cl	<i>Clearence</i>
Cl_{app}	<i>Apparent Clearence</i>
C_p	Concentración de la droga en plasma
$C_{proteína}$	Concentración de proteína determinada por ELISA
$C_{máx.}$	Concentración máxima plasmática de la droga
CV%	Coeficiente de variación
d	<i>Cohen's d</i> (tamaño del efecto)
D	Dilución
D_0	Dosis administrada
D_E	Cantidad de droga eliminada del organismo
DO	Densidad óptica
DS	Desvío estándar
D_{GI}	Cantidad de droga presente en el tracto gastrointestinal
F	Fracción absorbida
k_a	Constante de velocidad de absorción de la droga
k_e	Constante de velocidad de eliminación de la droga
k_{tr}	Constante de velocidad de tránsito de un compartimento a otro
K_A	Constante de afinidad
K_D	Constante de disociación
λ	Longitud de onda
L	Camino óptico

m	Número de réplicas por punto
M	Eje mayor del tumor
MTT	Tiempo en medio de tránsito
n	Número total de puntos / Número de compartimentos
N	Número de células contadas
S ₀	Desvío estándar de la concentración predicha para una muestra blanco
S _{fit}	Error residual del ajuste lineal
S _{xinc}	Incertidumbre en x por el ajuste
t	Tiempo
t _{1/2 elim}	Tiempo de vida media en circulación
T _m	Temperatura de <i>Melting</i>
T _{máx.}	Tiempo para alcanzar la concentración máxima plasmática de la droga
V _D	Volumen aparente de distribución
vol.	Volúmenes
W	Eje menor del tumor
X	Concentración de células
x _i	Concentración a cada nivel de la variable independiente
\bar{x}	Promedio de las concentraciones de calibrado
X _M	Concentración de células muertas
X _T	Concentración de células totales
X _V	Concentración de células viables

3. UNIDADES

cm	Centímetro
mm	Milímetro
μm	Micrómetro
nm	Nanómetro
cm ²	Centímetro cuadrado
kg	Kilogramo
g	Gramo
mg	Miligramo
μg	Microgramo
ng	Nanogramo
L	Litro
mL	Mililitro
μL	Microlitro
h	Hora
min	Minuto
s	Segundo
N	Normal
M	Molar
mM	Milimolar
μM	Micromolar
nM	Nanomolar
μmoles	Micromoles
pmoles	Picomoles
U o UI	Unidades Internacionales
kDa	Kilodalton
rpm	Revoluciones por minuto
g	Aceleración de la gravedad
mA	Miliamperio
V	Voltio
W	Vatio
% (v/v)	Mililitros de solvente en 100 mL de solución
% (p/v)	Gramos de soluto en 100 mL de solución
MΩ	Mega-ohmio
°C	Grado Celsius

4. CÓDIGO DE UNA Y TRES LETRAS PARA AMINOÁCIDOS

Alanina	A	Ala
Arginina	R	Arg
Asparagina	N	Asn
Aspártico	D	Asp
Cisteína	C	Cys
Fenilalanina	F	Phe
Glicina	G	Gly
Glutámico	E	Glu
Glutamina	Q	Gln
Histidina	H	His
Isoleucina	I	Ile
Leucina	L	Leu
Lisina	K	Lys
Metionina	M	Met
Prolina	P	Pro
Tirosina	Y	Tyr
Treonina	T	Thr

5. NOMENCLATURA DE AZÚCARES

Glucosa	Glc
Galactosa	Gal
Manosa	Man
Fucosa	Fuc
N-acetilglucosamina	GlcNAc
N-acetilgalactosamina	GalNAc
Ácido siálico	AS
N-acetilneuramínico	Neu5Ac o NeuAc
Ácido desoxisialico (N-glicolilneuramínico)	Neu5Gc
Xilosa	Xyl
Ácido glucurónico	GlcA
Ácido idurónico	IdoA
Arabinosa	Ara
Ribosa	Rib
Glucosamina	GlcN
Manosamina	ManN

RESUMEN

Las proteínas terapéuticas han revolucionado el tratamiento de numerosas enfermedades; sin embargo, su eficacia puede verse limitada por su rápida eliminación del organismo. Para optimizar su desempeño, se han desarrollado diversas estrategias destinadas a mejorar sus propiedades como estabilidad, solubilidad y farmacocinética. A su vez, disponer de herramientas analíticas eficientes para su detección, cuantificación y purificación resulta esencial para garantizar su calidad. En este contexto, los péptidos GMOP y mGMOP surgen como una plataforma innovadora con funcionalidad dual. El péptido GMOP deriva del extremo N-terminal (14 aminoácidos) del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y contiene cuatro sitios potenciales de O-glicosilación. Por su parte, mGMOP fue diseñado a partir de GMOP para incrementar la densidad de O-glicanos mediante la incorporación de residuos de prolina y treonina, alcanzando seis sitios potenciales de glicosilación. Estas etiquetas no solo permiten modular las propiedades biológicas y farmacocinéticas de las proteínas a las que se fusionan, sino que además contienen un epítopo N-terminal reconocido por el anticuerpo monoclonal denominado CC1H7 (mAb CC1H7), lo que habilita su empleo en métodos analíticos de detección, cuantificación y purificación. La interacción entre el epítopo y el mAb es dependiente de la fuerza iónica, característica que puede aprovecharse para optimizar el rendimiento de estas herramientas. En estudios previos a este trabajo de tesis, el potencial de los péptidos GMOP y mGMOP se exploró mediante la fusión de una única copia al interferón alfa-2b humano recombinante (rhIFN- α 2b). Las proteínas resultantes mostraron un incremento en la masa molecular y en el contenido de ácido siálico sin alterar significativamente la actividad antiviral *in vitro*, aunque con una reducción en la actividad antiproliferativa. A nivel farmacocinético, ambas variantes presentaron una mejora respecto del IFN-*wild type* recombinante humano (IFN-wt), evidenciando una mayor vida media y menor depuración aparente, pero sin diferencias marcadas entre ellas a pesar de los dos sitios adicionales de glicosilación presentes en mGMOP.

En este trabajo de tesis se evaluó en profundidad la bifuncionalidad de las etiquetas GMOP y mGMOP, analizando tanto su capacidad para incrementar la actividad biológica *in vivo* de diferentes proteínas de interés mediante la fusión de múltiples copias de los péptidos, generando un contexto de alta O-glicosilación, como su aplicación en metodologías de detección, cuantificación y purificación.

En cuanto a su uso como herramientas analíticas, se desarrollaron y optimizaron procedimientos de purificación por inmunofinidad (IAF), cuantificación y detección empleando las proteínas mGMOP-IFN (que contiene una única copia del péptido) y mGMOP₃-IFN-mGMOP (que múltiples copias del péptido y presenta un elevado grado de O-

glicosilación). En relación a la purificación, las condiciones óptimas de unión se estudiaron mediante un diseño experimental (DoE) factorial orientado a evaluar el efecto de distintas sales sobre la afinidad del sistema antígeno–anticuerpo. El análisis de la capacidad dinámica con las condiciones preseleccionadas mediante el DoE permitió definir como condición de captura el acondicionamiento de los sobrenadantes con Na_2SO_4 1 M, pH 8. Las condiciones de elución se definieron a partir de un ELISA tipo sándwich, que permitió seleccionar una solución de 50 mM fosfato, pH 11 para el desprendimiento eficiente de la proteína de la matriz, alcanzando rendimientos globales del 95–100% y purezas del 89–99% gracias a la combinación de alta fuerza iónica en la unión y un aumento del pH en la elución. Como sistema de cuantificación, se desarrolló un ELISA de competición optimizado mediante un diseño Box–Behnken, definiéndose las condiciones sensibilización, tiempo de competición y dilución de conjugado que minimizan los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) y maximizan la sensibilidad del sistema. Finalmente, el uso del sistema mGMOP-mAb CC1H7 como método de detección se confirmó por *western blot*, obteniéndose valores LOD y LOQ en el rango de nanogramos.

En relación a la influencia de los péptidos sobre las propiedades de las proteínas de fusión, las variantes GMOP₃-IFN-GMOP y mGMOP₃-IFN-mGMOP, expresadas en líneas sCHO, exhibieron un incremento de la masa molecular (11 y 14 kDa, respectivamente) y la aparición de múltiples isoformas ácidas asociadas a un mayor contenido de ácido siálico, como resultado de la O-glicosilación. Los estudios estructurales mediante dicroísmo circular demostraron que las fusiones no alteraron la conformación secundaria ni terciaria del rhIFN, aunque mejoraron su estabilidad térmica y plasmática. Ambas variantes presentaron menor actividad *in vitro* que el IFN nativo, con diferencias significativas entre ellas en la respuesta antiviral pero sin variaciones relevantes en la acción antiproliferativa. La variante mGMOP₃-IFN-mGMOP exhibió, además, propiedades farmacocinéticas mejoradas, con una mayor vida media y menor depuración aparente que GMOP₃-IFN-GMOP. En modelos *in vivo* en ratones *nude*, ambas proteínas redujeron el volumen y peso tumoral, aunque con un efecto más pronunciado en los tumores tratados con mGMOP₃-IFN-mGMOP, evidenciado por la disminución en la velocidad de crecimiento. Si bien no se pudo establecer con precisión si las diferencias en la farmacocinética o en la actividad *in vitro* tienen mayor influencia sobre la potencia *in vivo*, los resultados abren la posibilidad de realizar estudios adicionales ajustando dosis y tiempos experimentales para dilucidar estos aspectos.

Para validar la utilidad de las etiquetas GMOP y mGMOP como plataforma bifuncional, se generaron dos nuevas variantes (GMOP₃-EPO-GMOP y mGMOP₃-EPO-mGMOP) utilizando a la eritropoyetina recombinante humana (rhEPO) como proteína modelo. Ambas se purificaron por cromatografía de inmunoafinidad con el mAb CC1H7, alcanzando purezas del 96–99% y recuperaciones del 100%. Además, ambas fueron detectadas por *western blot* y

cuantificadas mediante ELISA de competición, con límites de detección y cuantificación comparables a los observados para las variantes de rhIFN. Estos resultados confirmaron la aplicabilidad del sistema como herramienta analítica robusta para los procedimientos de rutina.

Con respecto a la evaluación funcional, ambas variantes presentaron aumentos en la masa molecular aparente (12 y 15 kDa) y múltiples isoformas ácidas, conservando la estructura global estudiada mediante dicroísmo circular. Si bien la actividad eritropoyética *in vitro* fue menor que la de la rhEPO sin modificar, no se observaron diferencias significativas entre las variantes. Las mejoras farmacocinéticas fueron consistentes con las observadas para rhIFN, destacándose mGMOP₃-EPO-mGMOP por su mayor vida media y menor *clearance*. En estudios *in vivo*, consistentes en la estimulación de reticulocitos en ratones normocitéricos, ambas variantes mostraron una potencia superior a la rhEPO, aunque sin diferencias significativas entre ellas, indicando la necesidad de estudios adicionales para optimizar dosis y tiempos de administración.

En conjunto, los resultados de esta tesis demuestran que alcanzar un equilibrio adecuado entre la actividad biológica *in vitro* y las propiedades farmacocinéticas constituye un aspecto clave para el desarrollo de proteínas terapéuticas más efectivas e innovadoras. El uso de las etiquetas GMOP y mGMOP se consolida como una estrategia versátil y de alto potencial, capaz de mejorar el perfil farmacocinético de las proteínas fusionadas y, al mismo tiempo, ofrecer herramientas analíticas robustas para su purificación y seguimiento. En particular, el péptido mGMOP se destaca por conferir ventajas diferenciales en contextos de hiper-O-glicosilación, reforzando su valor como plataforma biotecnológica con amplias aplicaciones en el desarrollo de biofármacos de nueva generación.

SUMMARY

Therapeutic proteins have revolutionized the treatment of numerous diseases; however, their efficacy may be limited by rapid clearance from the organism. To optimize their performance, several strategies have been developed to improve properties such as stability, solubility, and pharmacokinetics. In addition, having efficient analytical tools for their detection, quantification, and purification is essential to ensure their quality. In this context, the GMOP and mGMOP peptides have emerged as an innovative dual-function platform. The GMOP peptide is derived from the N-terminal end (14 amino acids) of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and contains four potential O-glycosylation sites. In turn, mGMOP was designed based on GMOP to increase O-glycan density through the incorporation of proline and threonine residues, reaching six potential glycosylation sites. These tags not only enable the modulation of the biological and pharmacokinetic properties of the fusion proteins but also contain an N-terminal epitope recognized by the monoclonal antibody CC1H7 (mAb CC1H7), allowing their use in analytical methods for detection, quantification, and purification. The interaction between the epitope and the mAb is dependent on ionic strength, a characteristic that can be exploited to optimize the performance of these tools.

In studies preceding this thesis, the potential of the GMOP and mGMOP peptides was explored through the fusion of a single copy to recombinant human interferon alpha-2b (rhIFN- α 2b). The resulting proteins showed an increase in molecular mass and sialic acid content without significantly altering *in vitro* antiviral activity, although a reduction in antiproliferative activity was observed. At the pharmacokinetic level, both variants showed improved profiles compared to the wild-type recombinant human IFN (IFN-wt), exhibiting a longer half-life and lower apparent clearance, but without marked differences between them despite the two additional glycosylation sites present in mGMOP.

In this thesis, the bifunctionality of the GMOP and mGMOP tags was thoroughly evaluated, analyzing both their ability to enhance the *in vivo* biological activity of different proteins of interest through the fusion of multiple peptide copies, creating a highly O-glycosylated context, and their application in analytical methodologies for detection, quantification, and purification. Regarding their use as analytical tools, immunoaffinity purification, quantification, and detection procedures were developed and optimized using the proteins mGMOP-IFN (containing a single copy of the peptide) and mGMOP₃-IFN-mGMOP (carrying multiple copies of the peptide and exhibiting a high degree of O-glycosylation). For purification, the optimal binding conditions were studied through a factorial Design of Experiments (DoE) aimed at evaluating the effect of different salts on the antigen-antibody affinity. The analysis of the dynamic binding capacity under the preselected conditions defined by the DoE established the

conditioning of supernatants with 1 M Na₂SO₄, pH 8, as the optimal capture condition. Elution conditions were determined based on a sandwich-type ELISA, which enabled the selection of a 50 mM phosphate solution, pH 11, for the efficient release of the protein from the matrix, achieving overall yields of 95–100% and purities of 89–99%, due to the combination of high ionic strength during binding and increased pH during elution. For quantification, a competitive ELISA was developed and optimized using a Box–Behnken design, defining the sensitization mass, competition time, and conjugate dilution that minimized the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) while maximizing assay sensitivity. Finally, the use of the mGMOP–mAb CC1H7 system as a detection method was confirmed by western blot, yielding LOD and LOQ values within the nanogram range.

Regarding the influence of the peptides on the properties of the fusion proteins, the variants GMOP₃-IFN-GMOP and mGMOP₃-IFN-mGMOP, expressed in sCHO cell lines, exhibited an increase in molecular mass (11 and 14 kDa, respectively) and the appearance of multiple acidic isoforms associated with a higher sialic acid content, as a result of O-glycosylation.

Structural studies by circular dichroism demonstrated that the fusions did not alter the secondary or tertiary conformation of rhIFN, although they improved its thermal and plasma stability. Both variants showed lower *in vitro* activity than the native IFN, with significant differences between them in antiviral response but no relevant variations in antiproliferative activity. The mGMOP₃-IFN-mGMOP variant also exhibited improved pharmacokinetic properties, with a longer half-life and lower apparent clearance than GMOP₃-IFN-GMOP. In *in vivo* models using nude mice, both proteins reduced tumor volume and weight, although a more pronounced effect was observed in tumors treated with mGMOP₃-IFN-mGMOP, as evidenced by a decreased growth rate. Although it was not possible to determine precisely whether the differences in pharmacokinetics or *in vitro* activity have a greater influence on *in vivo* potency, these results open the possibility of conducting further studies adjusting doses and experimental times to elucidate these aspects.

To validate the usefulness of the GMOP and mGMOP tags as a bifunctional platform, two new variants (GMOP₃-EPO-GMOP and mGMOP₃-EPO-mGMOP) were generated using recombinant human erythropoietin (rhEPO) as a model protein. Both variants were purified by immunoaffinity chromatography using the mAb CC1H7, reaching purities of 96–99% and recoveries of 100%. In addition, both proteins were detected by western blot and quantified by competitive ELISA, with detection and quantification limits comparable to those observed for the rhIFN variants. These results confirmed the applicability of the system as a robust analytical tool for routine laboratory procedures.

Regarding the functional evaluation, both variants exhibited increases in apparent molecular mass (12 and 15 kDa, respectively) and multiple acidic isoforms, while maintaining their overall structure as determined by circular dichroism. Although the *in vitro* erythropoietic activity was

lower than that of unmodified rhEPO, no significant differences were observed between the variants. The pharmacokinetic improvements were consistent with those observed for rhIFN, with mGMOP₃-EPO-mGMOP showing the greatest enhancement, characterized by an extended half-life and reduced clearance. *In vivo* studies, based on reticulocyte stimulation in normocytic mice, revealed that both variants displayed higher potency than rhEPO, although without significant differences between them, indicating the need for further studies to optimize dosage and administration schedules.

Overall, the results of this thesis demonstrate that achieving an appropriate balance between *in vitro* biological activity and pharmacokinetic properties is a key aspect in the development of more effective and innovative therapeutic proteins. The use of the GMOP and mGMOP tags is established as a versatile and high-potential strategy capable of enhancing the pharmacokinetic profile of fused proteins while simultaneously providing robust analytical tools for their purification and monitoring. In particular, the mGMOP peptide stands out for conferring differential advantages in contexts of hyper-O-glycosylation, reinforcing its value as a biotechnological platform with broad applications in the development of next-generation biopharmaceuticals.



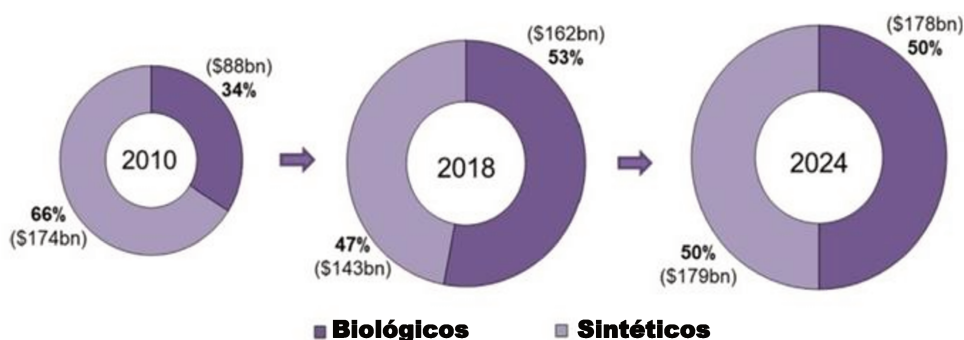
INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. DESARROLLO DE PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS

Los biofármacos, también llamados productos biológicos, son compuestos de origen biológico, tales como proteínas, ácidos nucleicos, productos derivados de la sangre, células somáticas y derivados producidos o extraídos de organismos vivos, que han traído enormes beneficios en el tratamiento de enfermedades (Castro y col., 2021). Particularmente, el desarrollo de proteínas terapéuticas marcó un hito en la historia de la medicina, con la aprobación de los primeros productos recombinantes durante la década de 1980. Este avance impulsó la creación de numerosos biofármacos innovadores destinados a mejorar la calidad de vida de millones de pacientes en todo el mundo.

En las últimas dos décadas, los productos biológicos se consolidaron como una categoría en expansión dentro de la industria farmacéutica. Desde 2002, se aprobaron más de 300 biofármacos (Tihanyi y Nyitray, 2020). Para 2018, estos productos representaban casi el 40% del total de la cartera global de investigación, y siete de los diez fármacos más vendidos a nivel global fueron terapéuticos basados en proteínas. Sólo entre 2018-2022 se aprobaron 197 biofarmacéuticos en Estados Unidos (EE UU) y/o la Unión Europea (UE) (Walsh, 2022). El mercado de bioterapéuticos ha ido creciendo exponencialmente, con una tasa de deserción clínica menor que la de los compuestos químicos, lo que se traduce en una mayor tasa de éxito general (Fig. 1) (Torres-Obreque y col., 2022). En 2021, las ventas globales de este tipo de terapias alcanzaron los 343 mil millones de dólares, con los productos innovadores —tanto anticuerpos monoclonales (mAbs) como otras proteínas— representando la mayor parte del mercado (Walsh, 2022). Actualmente, se estima que existen 443 productos biofarmacéuticos con licencia activa y hay más de 1000 en desarrollo clínico (Rondon y col., 2021). Las proteínas terapéuticas se destacan como los biológicos de mayor relevancia clínica (Sánchez-Trasviña y col., 2021) y su predominio en el mercado refleja el enorme impacto positivo que han tenido en la práctica clínica (Rocamora y col., 2023).



Drug Discovery Today

Figura 1: Evolución del mercado global farmacéutico. Fármacos biológicos versus sintéticos en el top 100 de productos farmacéuticos, según volumen de ventas (en billones de USD). Adaptada de Torres-Obreque y col. (2022).

1.1. Tipos de proteínas terapéuticas

Según la Organización Mundial de la Salud¹ (OMS), los biológicos son medicamentos profilácticos y terapéuticos derivados de fuentes biológicas, como órganos, tejidos, microorganismos o células animales. En particular, los bioterapéuticos constituyen un grupo compuesto principalmente por proteínas recombinantes producidas mediante biotecnología moderna a través del cultivo de células de diferentes especies. Se trata, en general, de macromoléculas biológicamente activas, grandes y complejas purificadas a partir de los sistemas de cultivo. Estas características los distinguen de los fármacos tradicionales, que se caracterizan por ser sintetizados químicamente y por presentar un tamaño pequeño.

Los biofármacos basados en proteínas se utilizan comúnmente para diagnosticar, prevenir, tratar y curar enfermedades o condiciones médicas (O'Flaherty y col., 2020). De esta forma, han revolucionado el tratamiento diversas patologías, desde enfermedades oncológicas y autoinmunes hasta trastornos genéticos raros, logrando un impacto significativo en la clínica. Según su actividad farmacológica, pueden agruparse en 5 categorías funcionales principales:

- a) Reemplazo de proteínas deficientes o defectuosas.
- b) Potenciación de vías fisiológicas existentes.
- c) Incorporación de funciones o actividades novedosas, no presentes de forma natural.
- d) Interferencia con moléculas u organismos.
- e) Transporte dirigido de otros compuestos o proteínas tales como radionucleidos, fármacos citotóxicos o proteínas efectoras.

Además, desde el punto de vista estructural y molecular, las proteínas terapéuticas se pueden clasificar en fármacos basados en anticuerpos, proteínas de fusión, factores de coagulación o crecimiento, enzimas terapéuticas, citoquinas y hormonas (Dimitrov, 2012).

Estas biomoléculas presentan diferentes ventajas en comparación con los fármacos sintéticos. Su elevada especificidad funcional, combinada con su complejidad estructural, les permite desempeñar funciones fisiológicas altamente específicas y complejas, que no pueden ser imitadas por compuestos químicos simples. Debido a su acción específica, interfieren mínimamente con los procesos biológicos normales y, por lo tanto, tienen una menor probabilidad de efectos adversos (Ebrahimi y Samanta, 2023). Además, muchos bioterapéuticos derivan de proteínas producidas naturalmente por el organismo, lo que suele traducirse en una buena tolerancia y baja inmunogenicidad (Rondon y col., 2021). Su diversidad funcional y alta selectividad hacia blancos patológicos explican su relevancia clínica, lo que los convierte en herramientas clave para el tratamiento de diversas enfermedades de manera precisa y eficaz (Song y col., 2023).

¹ <https://www.who.int/teams/health-product-policy-and-standards/standards-and-specifications/norms-and-standards/biotherapeutic-products>

2. DESAFÍOS EN LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS

2.1. Complejidad estructural

A diferencia de los fármacos de molécula pequeña, las proteínas terapéuticas presentan una arquitectura molecular más compleja y flexible, que condiciona su función biológica. No solo requieren una secuencia de aminoácidos precisa, sino también un plegamiento tridimensional adecuado y modificaciones postraduccionales (PTM, del inglés *posttranslational modifications*) específicas. Estas PTMs incluyen la fosforilación, metilación, acetilación y, en particular, la glicosilación, una de las más relevantes para el funcionamiento de los organismos vivos (He y col., 2024). Cabe resaltar que más del 50% de las proteínas humanas están glicosiladas, al igual que una gran proporción de bioterapéuticos disponibles para uso clínico. La composición de los glicanos unidos puede influir de manera significativa en la eficacia e inmunogenicidad del fármaco (Gupta y Shukla, 2018). Estas características estructurales son esenciales para garantizar la estabilidad, eficacia y seguridad (Pisal y col., 2010).

Asimismo, para que las proteínas actúen como terapias eficaces, es fundamental conservar su estabilidad tanto durante el almacenamiento como en el entorno biológico *in vivo*. Muchas proteínas son susceptibles a fenómenos como la agregación, la degradación o la desnaturalización, lo que puede reducir considerablemente su eficacia. Algunas también son sensibles a variaciones moderadas de temperatura, lo cual representa una preocupación adicional para su transporte y almacenamiento en distintas ubicaciones (Ma y col., 2020).

Por otro lado, los residuos presentes en la superficie de ciertas proteínas pueden interactuar con los materiales de los recipientes, provocando su adsorción y, en consecuencia, una disminución en la concentración del principio activo disponible para ejercer su acción terapéutica (Ebrahimi y Samanta, 2023).

2.2. Proceso de obtención

Debido a su mayor complejidad estructural, las proteínas terapéuticas no pueden ser sintetizadas completamente mediante métodos químicos. Por este motivo, el desarrollo y la producción de bioterapéuticos plantean desafíos muy diferentes a los que se presentan en la obtención de moléculas pequeñas utilizadas tradicionalmente como fármacos. Los procesos de producción de proteínas recombinantes suelen involucrar numerosos pasos críticos y resultan considerablemente más complejos que los necesarios para elaborar un fármaco de molécula pequeña.

Estas proteínas deben ser producidas en sistemas biológicos, como células u organismos vivos, lo cual introduce múltiples variables que afectan directamente la calidad del producto final. La elección del tipo celular, el origen de la especie y las condiciones de cultivo impactan

de forma decisiva en la estructura y funcionalidad de la proteína. Muchos de los bioterapéuticos exitosos son glicoproteínas, las cuales requieren explícitamente sistemas de expresión en células de mamíferos para adquirir modificaciones postraduccionales similares a las humanas (Papathanasiou y Kontoravdi, 2020).

Además, los contaminantes relacionados con los procesos de fabricación pueden afectar de manera significativa los perfiles de seguridad y eficacia de los medicamentos biofarmacéuticos (O'Flaherty y col., 2020). Es por esto que las proteínas obtenidas requieren una purificación exhaustiva, junto con procesos adicionales de inactivación viral y filtración específica para garantizar su seguridad (Lagassé y col., 2017).

Una vez que se obtienen estos productos biológicos, la caracterización debe ser sumamente rigurosa. Parámetros como la identidad, potencia, pureza, estabilidad y calidad deben definirse con precisión, ya que cualquier variación entre lotes puede afectar la eficacia clínica o generar reacciones adversas.

Este alto nivel de exigencia, junto con la necesidad de acelerar los tiempos y reducir costos, son factores clave que impulsan la mejora continua de los procesos en las etapas de *upstream* y *downstream* de la producción (O'Flaherty y col., 2020). Estos desafíos representan un aspecto central en el desarrollo y la producción de medicamentos proteicos recombinantes (Song y col., 2023).

2.3. Limitaciones farmacológicas y clínicas

Si bien, como se mencionó anteriormente, los bioterapéuticos presentan ventajas sustanciales frente a los fármacos convencionales, su aplicación clínica también enfrenta múltiples desafíos. Entre las principales dificultades se encuentra su corta vida media en el organismo, baja solubilidad, inestabilidad fisicoquímica y susceptibilidad a la degradación proteolítica (Pfister y Morbidelli, 2014).

Para lograr un desempeño clínico óptimo, las proteínas terapéuticas deben exhibir propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas adecuadas. Cuando estas resultan desfavorables, se hace necesario administrar el biofármaco varias veces por semana o incluso por día para mantener concentraciones terapéuticas eficaces. Esta frecuencia, además de causar incomodidad y reducir la calidad de vida del paciente, puede producir niveles plasmáticos del fármaco fluctuantes o subóptimos, lo que disminuye la eficacia del tratamiento y aumenta el riesgo de efectos adversos sistémicos (Rondon y col., 2021).

Por otra parte, los bioterapéuticos pueden inducir respuestas inmunes no deseadas, especialmente cuando se administran de forma crónica y prolongada o se obtienen mediante sistemas de expresión procariotas. En estos casos, la inmunogenicidad se convierte en un problema clínico importante: la producción de anticuerpos neutralizantes contra la proteína exógena puede disminuir progresivamente su eficacia, comprometer la continuidad del

tratamiento e incluso inducir reacciones adversas graves, como anafilaxia (Rondon y col., 2021).

Si bien se han desarrollado estrategias diversas para conferirles propiedades beneficiosas, como mayor estabilidad o mejor biodisponibilidad, resulta esencial que estas modificaciones no comprometan su actividad biológica o potencia farmacológica. En este sentido, preservar una alta actividad específica es clave para asegurar la eficacia del tratamiento (Ebrahimi y Samanta, 2023).

2.3.1. Eliminación de las proteínas terapéuticas

Como se mencionó previamente, muchas proteínas terapéuticas presentan una vida media plasmática muy corta, lo que limita su utilidad en tratamientos que requieren un efecto sostenido o exposición prolongada. Esta rápida eliminación es consecuencia de diversos mecanismos de eliminación que forman parte de su perfil farmacocinético, en particular la degradación enzimática, la depuración renal, la captación hepática y, en ciertos casos, la eliminación mediada por el sistema reticuloendotelial (Khodabakhsh y col., 2021). A su vez, varios factores estructurales y bioquímicos de las proteínas determinan su susceptibilidad a estos mecanismos de eliminación.

La velocidad de eliminación depende de características intrínsecas de la proteína, como su peso molecular, tamaño o volumen hidrodinámico, estructura tridimensional, carga superficial y grado de glicosilación. Estas propiedades no solo determinan su estabilidad *in vivo*, sino también su interacción con los sistemas encargados de su eliminación.

Una de las principales vías de eliminación es la filtración renal, mecanismo por el cual muchos bioterapéuticos basados en proteínas son eliminados debido a su tamaño y características hidrofóbicas. Las proteínas con un peso molecular inferior al umbral de filtración glomerular (menores a ~30 kDa) atraviesan fácilmente la membrana basal del glomérulo y son rápidamente excretadas en la orina, lo que reduce drásticamente su tiempo de residencia en circulación (Rocamora y col., 2023). En consecuencia, muchas proteínas pequeñas pueden eliminarse del organismo en pocas horas. La carga superficial también desempeña un papel importante: proteínas con carga negativa tienden a repelerse electrostáticamente de la membrana basal glomerular, también negativa, lo cual puede disminuir su depuración renal, mientras que las moléculas neutras la atraviesan con mayor facilidad (Zaman y col., 2019).

Las proteínas de mayor tamaño o aquellas que evaden la filtración glomerular pueden ser eliminadas por captación hepática. Este proceso suele estar mediado por receptores específicos presentes en la superficie de los hepatocitos, que internalizan las proteínas y las dirigen hacia compartimentos lisosomales donde son degradadas por enzimas. Este tipo de metabolismo hepático contribuye de manera significativa a la eliminación de proteínas exógenas, del mismo modo que ocurre con muchas proteínas endógenas. Los receptores de

asialoglicoproteínas (ASGPR), que reconocen glicoproteínas que exhiben una galactosa o una N-acetilgalactosamina terminal, es decir, oligosacáridos desializados, son de gran importancia para la eliminación de las glicoproteínas terapéuticas (Chia y col., 2023).

Otra vía importante de eliminación es la degradación enzimática sistémica. Muchas proteínas terapéuticas son susceptibles a la acción de proteasas presentes en la circulación o en los tejidos, que pueden fragmentarlas parcial o totalmente. Estas proteasas pueden ser específicas de ciertos tejidos u órganos, o inespecíficas, distribuyéndose ampliamente en distintos compartimentos del organismo. A su vez, esta degradación puede ocurrir en el espacio extracelular, como sucede con las proteínas dietarias o endógenas, o a nivel intracelular, generalmente en lisosomas tras su endocitosis. El proceso puede ser inespecífico —como ocurre con muchas enzimas lisosomales que degradan proteínas sin requerir secuencias definidas— o depender de motivos estructurales o secuencias específicas dentro de la proteína. Una estructura tridimensional que enmascare regiones de clivaje puede dificultar el acceso de proteasas a zonas susceptibles de degradación. En todos los casos, el tamaño molecular, el plegamiento (estructura secundaria y terciaria) y el grado de glicosilación influyen notablemente en la velocidad y eficiencia de la degradación (Conner y col., 2020).

Adicionalmente, ciertas proteínas pueden ser eliminadas mediante fagocitosis o pinocitosis por parte de macrófagos y otras células del sistema reticuloendotelial. Este mecanismo cobra especial relevancia en el caso de proteínas agregadas, mal plegadas o reconocidas como extrañas por el sistema inmunitario. Finalmente, proteínas con alta hidrofobicidad tienden a acumularse en el hígado, lo que también acelera su depuración (Zaman y col., 2019).

En este contexto, diversas propiedades de las proteínas pueden ser modificadas para mejorar su estabilidad y prolongar su vida media, como el tamaño, la carga superficial, el grado de glicosilación, la hidrofobicidad y la accesibilidad de regiones sensibles a la proteólisis.

La Fig. 2 resume los mecanismos que limitan el tiempo de residencia de las proteínas terapéuticas en sangre, junto con algunas de las estrategias utilizadas para contrarrestarlos.

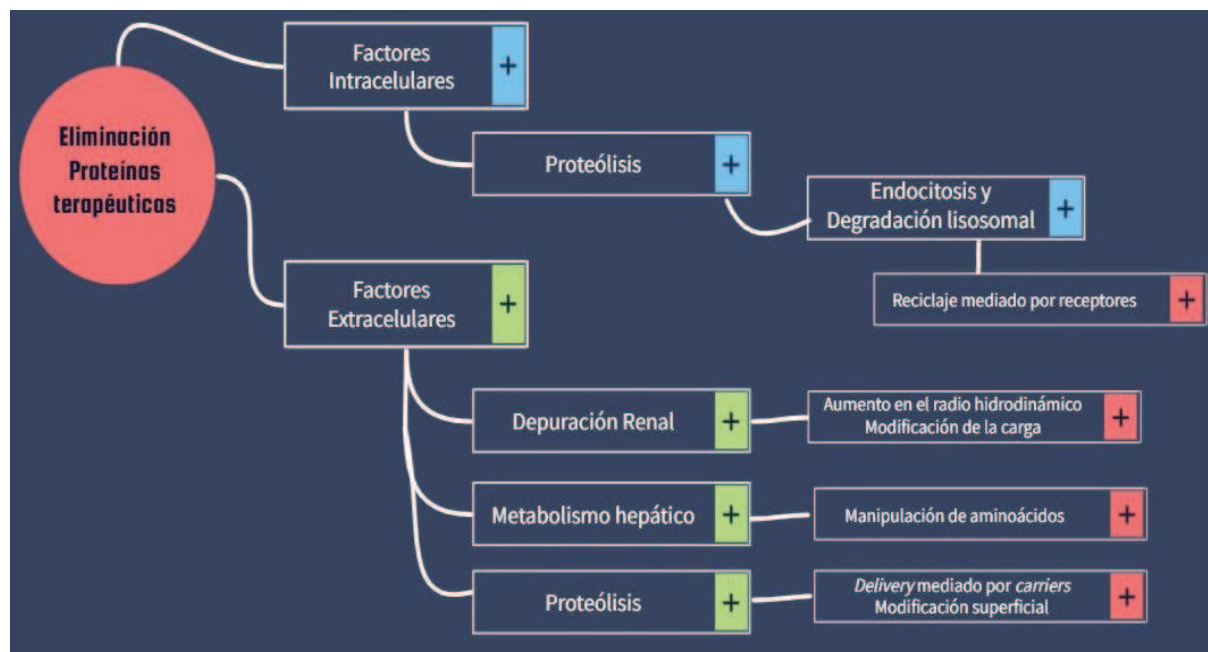


Figura 2: Eliminación de proteínas terapéuticas. Factores que limitan el tiempo de residencia de una proteína en circulación y algunas estrategias para contrarrestarlos. Imagen adaptada de Zaman y col. (2019).

3. ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LAS PROPIEDADES DE BIOTERAPÉUTICOS

Para enfrentar los desafíos inherentes al uso clínico de proteínas terapéuticas, se han desarrollado múltiples estrategias de diseño basadas en ingeniería de proteínas y de células. El objetivo es generar formulaciones más eficaces que superen las limitaciones de las proteínas originales mediante modificaciones estructurales o funcionales. Este enfoque ha permitido el desarrollo de los llamados *biobetters*, versiones optimizadas de productos biológicos existentes que presentan propiedades mejoradas, como mayor potencia, especificidad, estabilidad o vida media, así como una reducción de los efectos adversos. Entre las principales estrategias implementadas se destacan (Fig. 3):

- **Mutagénesis sitio-dirigida:** Esta técnica permite introducir mutaciones puntuales, planificadas y controladas, en la secuencia de aminoácidos de una proteína, con la finalidad de modificar propiedades específicas sin comprometer su función global. Se utiliza para alterar la carga neta o el punto isoeléctrico (pI), modificando la solubilidad y la velocidad de absorción; estabilizar la conformación evitando la agregación o la formación de enlaces disulfuro no deseados; prolongar la vida media modulando las interacciones con receptores que regulan el reciclaje o la degradación intracelular; o ajustar funciones efectoras, como la citotoxicidad mediada por anticuerpos.
- **Conjugación anticuerpo-fármaco:** Esta estrategia combina la alta especificidad de un anticuerpo con el efecto letal de un agente citotóxico. El anticuerpo actúa como vector de direccionamiento hacia células específicas (por ejemplo, células tumorales), mientras que el fármaco se une covalentemente a través de un *linker* estable en circulación, diseñado

para romperse dentro de la célula diana y liberar el agente activo de forma localizada, minimizando efectos secundarios sistémicos y aumentando la eficacia terapéutica.

- **PEGilación:** Consiste en la unión covalente de cadenas de polietilenglicol (PEG) a residuos específicos o inespecíficos (usando lisinas) de la superficie de la proteína. Esta modificación aumenta el tamaño hidrodinámico, reduciendo su filtración renal, y actúa como una barrera que protege contra la degradación por proteasas e interacción con el sistema inmune, pero puede disminuir la actividad biológica si interfiere con el sitio activo o induce respuestas inmunes no deseadas.

- **Conjugación con polímeros distintos a PEG:** Se basa en la unión de polímeros alternativos al PEG a la proteína de interés, que pueden ser naturales, como los polisacáridos, o sintéticos, específicamente diseñados. Estos polímeros aportan beneficios similares a los del PEG, pero con mayor biodegradabilidad y menor inmunogenicidad (Sánchez-Trasviña y col., 2021).

- **Fusión a Fc:** Comprende la fusión genética de la proteína terapéutica con la región Fc de una inmunoglobulina G (IgG), la cual prolonga la circulación sanguínea al interactuar con el receptor FcRn o receptor neonatal, que media su reciclaje intracelular. Puede conferir propiedades efectoras adicionales como citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) o fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (FCDA), aunque esto puede ser indeseable en ciertos contextos (Conner y col., 2020).

- **Fusión a proteínas:** La proteína terapéutica se fusiona a otra proteína con propiedades deseadas, por ejemplo, de larga vida media, como la albúmina sérica humana (HSA), la cual permite prolongar la estabilidad en sangre, reducir la degradación proteolítica y mejorar la distribución sistémica. También puede añadir nuevas funciones, como capacidad de multienlace o transporte activo a ciertos tejidos.

- **Fusión a polipéptidos:** Esta estrategia implica la fusión de secuencias de aminoácidos naturales como XTEN, PAS o ELP para modular el tamaño y las propiedades fisicoquímicas de la proteína. Estos polipéptidos son biodegradables, no inmunogénicos, y su longitud y composición pueden ser ajustadas para controlar la vida media, la solubilidad o la tasa de eliminación. A diferencia del PEG, no requieren conjugación química post-expresión ya que son codificados directamente en la construcción genética (Khodabakhsh y col., 2021).

- **Glicoingeniería:** Se basa en la modificación de la cantidad y/o calidad de los glicanos de una proteína con el fin de mejorar la estabilidad estructural, enmascarar epítopos o sitios de degradación, o prolongar la vida media (por ejemplo, aumentando la sialidación). También puede potenciar funciones efectoras, como en el caso de anticuerpos afucosilados con mayor actividad citotóxica.

- **Lipidación:** Esta técnica implica la unión covalente de grupos lipídicos (como ácidos grasos) a la proteína, los cuales se pueden unir reversiblemente a la albúmina en sangre, que actúa como transportador, prolongando su vida media. Además, los lípidos pueden facilitar la formación de agregados reversibles que actúan como reservorios de liberación lenta tras la administración subcutánea y mejorar la internalización celular al favorecer el transporte a nivel de membranas. No obstante, la conjugación lipídica puede inducir inmunogenicidad o afectar negativamente la actividad si interfiere con el sitio responsable de su función.
- **Diseño computacional de proteínas (racional y *de novo*):** Es una herramienta prospectiva, que se basa en el uso de modelos biofísicos y simulaciones estructurales para predecir plegamiento y comportamiento funcional, optimizando propiedades como estabilidad, afinidad por el blanco terapéutico, inmunogenicidad o farmacocinética. El diseño *de novo* permite crear proteínas con secuencias inéditas y funciones nuevas o mejoradas con respecto a las naturales, explorando regiones del espacio de secuencias no aprovechadas por la evolución.
- **Ingeniería de carga superficial (proteínas supercargadas):** Consiste en el diseño de variantes con una alta densidad de carga neta (más de una carga por cada kDa de masa molecular). Esta propiedad impide la agregación por repulsión electrostática, aumenta la resistencia a condiciones extremas (como estrés térmico o químico) y facilita la captación celular, especialmente si tienen carga positiva. Pueden usarse como vectores para transportar otras proteínas hacia el interior celular, aunque su uso puede estar limitado por toxicidad o inmunogenicidad.
- **Uso de aminoácidos no naturales (UAAs, del inglés *unnatural amino acids*):** Mediante tecnologías de codón expandido, se incorporan aminoácidos con grupos funcionales no naturales en posiciones específicas de la proteína. Esto permite realizar conjugaciones químicas controladas, generar interacciones covalentes inducidas por proximidad o facilitar el direccionamiento celular multivalente. Los UAAs amplían el repertorio funcional disponible en las proteínas, aunque su eficiencia de incorporación y el posible impacto en la estructura nativa son desafíos a considerar (Ebrahimi y Samanta, 2023).

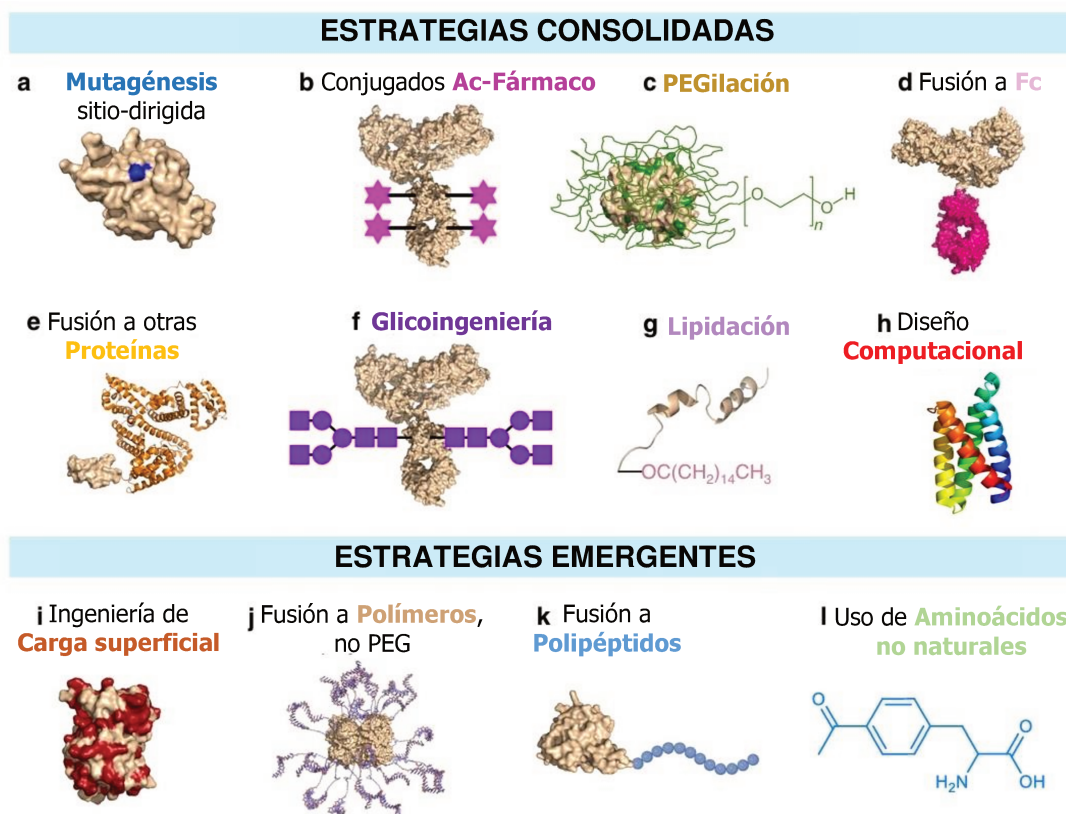


Figura 3: Estrategias de diseño. Estrategias consolidadas y emergentes para el desarrollo de bioterapéuticos basados en proteínas. Adaptada de Ebrahimi y Samanta (2023) .

En términos generales, las estrategias descritas comparten un objetivo común: mejorar las propiedades farmacocinéticas y la eficacia terapéutica de las proteínas. Entre ellas, la conjugación con grupos PEG y la fusión al dominio Fc de IgG han sido las más utilizadas. No obstante, otras estrategias que han cobrado un interés creciente en los últimos años —y para las cuales ya existen terapias aprobadas para uso clínico— incluyen la lipidación, la fusión a albúmina y la glicoingeniería (Sánchez-Trasviña y col., 2021), constituyendo esta última la estrategia utilizada en el presente trabajo.

3.1. Glicoingeniería

Como se mencionó anteriormente, la glicoingeniería es una herramienta poderosa que permite modificar la cantidad de glicanos (mediante la adición o eliminación de sitios potenciales de N-glicosilación o de comprobada O-glicosilación) y/o la calidad de los glicanos, alterando el perfil de glicosilación nativo de una proteína (Rocamora y col., 2023). Esta estrategia ofrece un gran potencial y ha sido invaluable en el desarrollo de bioterapéuticos con eficacia clínica optimizada (Dammen-Brower y col., 2022). En los últimos años —y con perspectivas cada vez más amplias— la glicosilación ha cobrado un rol central no solo en las propiedades farmacocinéticas, sino también en la farmacodinamia y en la eficacia terapéutica

de las proteínas recombinantes. Un perfil de glicosilación adecuado mejora la actividad biológica, estabilidad, vida media y reduce la inmunogenicidad (Tihanyi y Nyitray, 2020).

Para comprender esta tecnología, es fundamental introducir primero qué es la glicosilación, sus tipos y su relevancia funcional, aspectos que se abordan a continuación.

3.1.1. Glicosilación

La glicosilación es un proceso enzimático mediante el cual se unen covalentemente carbohidratos a distintos tipos de biomoléculas, como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos u otros carbohidratos. Este proceso es catalizado principalmente por glicosiltransferasas (GTs), que transfieren azúcares activados en forma de nucleótido-azúcar a aceptores específicos. Además, participan glicosidasas, que eliminan ciertos residuos sacarídicos mediante la ruptura de enlaces glicosídicos, regulando así el procesamiento. La acción coordinada de ambas clases de enzimas permite la construcción y remodelación de estructuras de glicanos complejos (Narimatsu y col., 2021).

En células de mamífero, el sistema de glicosilación comprende una red metabólica amplia y compleja de enzimas y proteínas accesorias que orquestan la síntesis de distintos tipos de glicanos presentes en glicolípidos, glicoproteínas, proteoglicanos y como oligosacáridos libres (Ma y col., 2020). Más de 200 genes codifican diferentes GTs, de los cuales al menos 173 participan en 16 vías distintas de ensamblaje que explican la enorme diversidad estructural de glicanos (Narimatsu y col., 2021). Se estima que unas 700 proteínas contribuyen a generar más de 7000 estructuras glicosídicas distintas (Moremen y col., 2012).

En particular, cuando los carbohidratos se unen a proteínas, el proceso de glicosilación ocurre de forma co- o postraduccional, siendo una de las PTMs más abundantes y extendidas en células eucariotas (Rocamora y col., 2023). Este proceso implica la formación de un enlace glicosídico entre el grupo hidroxilo anomérico de un azúcar y una cadena polipeptídica. Esta reacción es finamente regulada y depende del tipo celular, el ambiente intracelular, la localización subcelular y la disponibilidad de enzimas y precursores (Loeza-Reyes y col., 2021). Debido a la diversidad estructural de los glicanos, una misma glicoproteína puede existir en múltiples “glicoformas”, que difieren tanto en la ocupación de los sitios de glicosilación (macroheterogeneidad) como en la estructura específica de los glicanos unidos (microheterogeneidad). Esta heterogeneidad no solo incrementa la diversidad estructural de las proteínas, sino que también desempeña un papel fundamental en la regulación de las características y actividades de las mismas (Bello y col., 2019).

3.1.1.1. Tipo y estructura de oligosacáridos

Los oligosacáridos que se ensamblan a proteínas en los sistemas eucariotas están formados por la combinación de más de diez monosacáridos diferentes, entre los que se encuentran

comúnmente: fucosa (Fuc), galactosa (Gal), glucosa (Glc), N-acetilgalactosamina (GalNAc), N-acetilglucosamina (GlcNAc), manosa (Man), ácido siálico, xilosa (Xyl), ácido glucurónico (GlcA) y ácido idurónico (IdoA). A partir de estos bloques básicos, se generan estructuras lineales o ramificadas, cuya diversidad supera ampliamente la de los ácidos nucleicos y la de las proteínas, especialmente considerando los tipos de enlace estereoespecífico y modificaciones posteriores (Moremen y col., 2012).

Los oligosacáridos se unen a las cadenas polipeptídicas a través de distintos tipos de enlace. Según el tipo de aminoácido y de glicano involucrado, se reconocen cuatro categorías principales:

- **N-glicosilación:** unión al grupo amida de residuos de asparagina (Asn).
- **O-glicosilación:** unión al grupo hidroxilo de residuos de serina (Ser) o treonina (Thr).
- **C-glicosilación:** unión de una manosa al anillo indol en la posición C2 del triptófano (Trp) mediante un enlace carbono-carbono. Es una glicosilación rara y se la conoce también como C-manosilación.
- **Anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI):** unión de estructuras glicosiladas complejas de anclaje que enlazan grupos glicosilfosfatidilinositol al extremo C- del esqueleto proteico, permitiendo su fijación a la membrana celular. Esta modificación está ausente en las formas secretadas de las glicoproteínas y puede revertirse por acción de fosfolipasas.

La N- y O-glicosilación son las formas más frecuentes (He y col., 2024) y permiten clasificar a las glicoproteínas en tres tipos: N-glicosiladas, O-glicosiladas y N, O-glicosiladas.

3.1.1.1.1. N-glicosilación

La N-glicosilación es una modificación cotraduccional que ocurre en el retículo endoplasmático (RE), mediante la cual un oligosacárido se une covalentemente, a través de un enlace tipo amida, a la cadena lateral del residuo de Asn presente dentro de la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr (donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina). En eucariotas, este oligosacárido suele ser GlcNAc y la vía de síntesis está conservada (Ortega y col., 2018). Si bien la presencia de esta secuencia consenso es necesaria, no garantiza la glicosilación del sitio, ya que la eficiencia del proceso depende de múltiples factores estructurales y celulares. En efecto, la frecuencia de glicosilación de estos sitios es variable (He y col., 2024).

Todos los glicanos unidos por N-glicosilación comparten un núcleo en común o *core* (Asn-GlcNAc₂Man₃) sobre el cual se adicionan residuos que definen la estructura final. Según el patrón de ramificación, los N-glicanos se clasifican en tres tipos principales (Fig. 4):

- **Alta manosa:** contienen de 2 a 6 residuos de Man. Se generan en el RE.

- **Complejos:** poseen dos o más ramificaciones que incluyen residuos como GlcNAc (unidos al *core*), Gal y ácido siálico. Se sintetizan en el aparato de Golgi.
- **Híbridos:** combinan características de los glicanos de alta manosa y de los complejos. Su biosíntesis también ocurre en el aparato de Golgi.

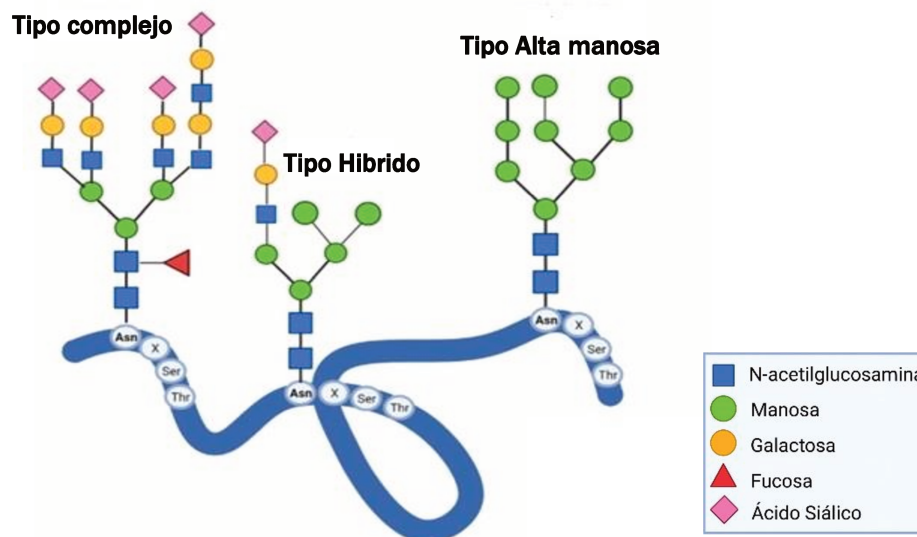


Figura 4: Tipos de N-glicanos. Estructuras de N-glicosilación tipo alta manosa, compleja e híbrida, unidas a un residuo de Asn de la secuencia proteica. Adaptado de Loaeza-Reyes y col. (2021).

Tanto los N-glicanos tipo híbrido como complejos pueden ser bi-, tri- o tetraantenarios, de acuerdo con el número de ramas que posean. La adición de un residuo GlcNAc directamente a la Man central del *core* constituye la estructura GlcNAc bisectante (Dicker y Strasser, 2015). La biosíntesis de estos oligosacáridos comienza en el RE, donde se ensambla una cadena de 14 azúcares ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) sobre el lípido dolicol fosfato. Este oligosacárido se transfiere en bloque a un residuo de Asn de la proteína naciente. Luego, en el RE y el aparato de Golgi, se eliminan y añaden azúcares mediante enzimas específicas, generando las estructuras finales de glicanos complejos o híbridos que determinan funciones biológicas específicas y propiedades fisicoquímicas de la proteína (Svecla y col., 2025).

3.1.1.1.2. O-glicosilación

La O-glicosilación es una modificación postraduccional que consiste en la adición covalente de un monosacárido a un grupo hidroxilo de la cadena lateral de ciertos aminoácidos, principalmente Ser y Thr, y en menor medida Tyr. Esta unión ocurre a través de un enlace oxígeno (O-glicosídico) y da lugar a diversas estructuras de glicanos, cuya composición y función dependen del tipo de azúcar incorporado y de la enzima que cataliza la transferencia, ya que diferentes isoformas pueden reconocer distintos contextos estructurales o secuenciales (Bennett y col., 2012).

Según el monosacárido inicial que se transfiere, existen distintos tipos de O-glicosilación. Entre todas estas variantes, la O-GalNAcilación, también conocida como O-glicosilación tipo mucina, es la más ampliamente distribuida y caracterizada en mamíferos. Esta forma se distingue por la unión de GalNAc a residuos de Ser/Thr, y ocurre principalmente en proteínas secretadas y en los dominios extracelulares de proteínas de membrana (Darula y Medzihradzsky, 2018).

A diferencia de la N-glicosilación, este tipo de O-glicosilación no depende de una secuencia consenso definida, ya que las regionesceptoras son altamente diversas. Tiene lugar en el RE y el aparato de Golgi, y comienza con la transferencia de un residuo de GalNAc desde una molécula activada con uridina-5'-difosfato (UDP-GalNAc) hacia un residuo Ser/Thr, catalizada por una GalNAc-transferasa (Thompson y Wakarchuk, 2022). Debido a que esta modificación es postraduccional, solo los residuos expuestos tras el plegamiento proteico son accesibles a la modificación. Aunque en principio cualquier Ser/Thr expuesta constituye un sitio potencial de glicosilación, se ha observado una preferencia estructural: las regiones glicosiladas suelen presentar una alta densidad de Ser, Thr, Ala y Pro, siendo frecuente la presencia de una Pro en la posición +3 respecto a la Ser/Thr modificada. Del mismo modo a lo que sucede durante la N-glicosilación, la Thr suele glicosilarse con mayor eficiencia que la Ser (Jensen y col., 2010).

A partir del residuo inicial de GalNAc, las cadenas O-glicosídicas pueden elongarse mediante adición secuencial de monosacáridos por acción de diversas GTs, generando una gran variedad de estructuras (Roth y col., 2012), que se agrupan en ocho tipos centrales o *cores*, (Fig. 5) (Darula y Medzihradzsky, 2018).

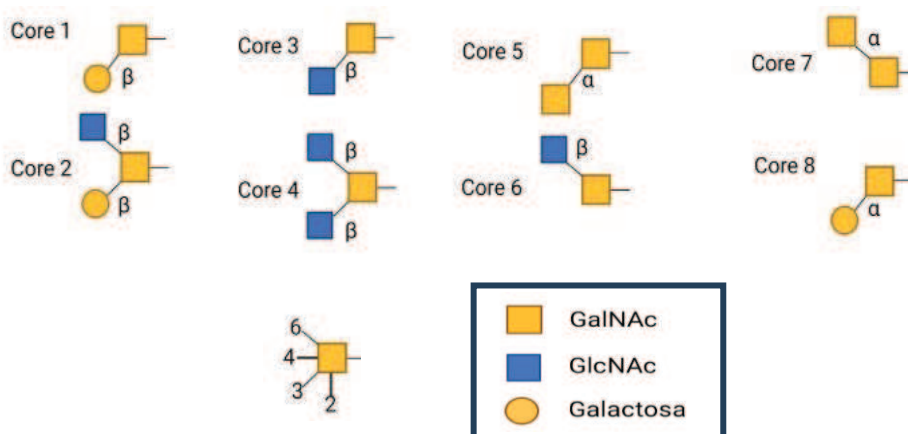


Figura 5: Estructuras centrales (*cores*) de O-glicanos tipo mucina. Se ilustran las 8 estructuras reportadas, que difieren en los patrones de elongación del residuo de GalNAc unido a residuos de Ser/Thr. Las posiciones de enlace entre los monosacáridos se indican mediante las líneas de conexión. Adaptado de Loaeza-Reyes y col. (2021).

Los *cores* 1 y 2 son los más prevalentes en humanos y constituyen la base sobre la cual se construyen glicanos más largos y ramificados. Las estructuras 3 y 4 también se encuentran en humanos, pero su expresión es más restringida, observándose principalmente en tejidos como el intestino y el epitelio colónico. Los *cores* 5 a 8 también son menos comunes y se encuentran presentes en tejidos específicos o en otras especies.

3.1.1.2. Rol biológico de la glicosilación e impacto sobre las propiedades de las proteínas terapéuticas

Los glicanos son componentes clave de una gran variedad de productos terapéuticos, que incluyen desde proteínas naturales hasta moléculas diseñadas racionalmente mediante ingeniería de glicoproteínas recombinantes (Berger y col., 2012). La glicosilación ejerce un marcado efecto sobre las propiedades biológicas y la eficacia terapéutica de las proteínas. A nivel biológico, los glicanos cumplen funciones esenciales al regular múltiples aspectos del comportamiento de las proteínas a las que están unidos, participando en su correcto plegado, control de calidad, estabilidad estructural y tráfico intracelular (Narimatsu y col., 2021). Además, los glicanos modulan interacciones proteína-proteína, procesos de reconocimiento celular y mecanismos inmunológicos (He y col., 2024; Ma y col., 2020).

Esta diversidad funcional es posible gracias a la elevada complejidad estructural de los glicanos, que permite una regulación precisa de las propiedades biofísicas y biológicas de las glicoproteínas (Lisowska y Jaskiewicz, 2012). Su presencia influye notablemente en propiedades clave como el tamaño, la masa molecular, la estabilidad térmica y la resistencia a la proteólisis. Por eso, la glicosilación no solo condiciona el comportamiento de una proteína en el entorno celular, sino que también impacta profundamente en su solubilidad, vida media, farmacocinética, actividad biológica y antigenicidad/inmunogenicidad. En consecuencia, constituye un factor determinante en el diseño y desempeño de proteínas terapéuticas (Lalonde y Durocher, 2017).

3.1.1.2.1. Efecto sobre estabilidad y solubilidad

La glicosilación desempeña un papel fundamental en la estabilidad y solubilidad de las proteínas. La presencia de grupos grandes e hidrofílicos, como los glicanos, contribuye a protegerlas frente a la oxidación y frente a condiciones adversas como pH extremo, calor o congelamiento, y a prevenir la formación de agregados que comprometen su actividad biológica (Berger y col., 2012). Además, brinda protección frente a la degradación proteolítica. Estos efectos se explican por varios mecanismos, como el enmascaramiento de sitios de clivaje, el refuerzo de interacciones intra- e intermoleculares (como fuerzas electrostáticas y enlaces de hidrógeno), la restricción de la movilidad conformacional que preserva el entorno

estructural y mantiene las interacciones hidrofóbicas internas, y la generación de contactos específicos con aminoácidos cercanos al sitio de glicosilación.

Estos factores estabilizan la estructura nativa y aumentan la rigidez conformacional de la proteína. Los glicanos generan impedimento estérico que limita el acceso de proteasas a regiones susceptibles, contribuyendo así a la protección frente a la degradación enzimática (Solá y col., 2007).

Paralelamente, la glicosilación mejora la solubilidad al aumentar el área superficial accesible al solvente, enmascarar residuos hidrofóbicos en la superficie proteica y modificar la carga neta de la molécula, especialmente por la presencia de residuos de ácido siálico, lo que reduce la probabilidad de agregación (Costa y col., 2014).

El efecto estabilizador depende de la estructura química del glicano, el sitio de unión, el tipo de enlace con la cadena peptídica y el contexto local de la secuencia proteica. En diversas glicoproteínas terapéuticas, como el interferón beta humano (hIFN- β), la alfa-1 antitripsina, el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y la eritropoyetina humana (hEPO), la eliminación de glicanos se asocia con mayor susceptibilidad a la agregación y pérdida de estabilidad térmica. Asimismo, la remoción de ácidos siálicos terminales, como en el caso de la hEPO, incrementa la susceptibilidad a la desnaturalización. Por el contrario, la incorporación de glicosilaciones específicas, como la O-manosilación en la insulina, puede mejorar la resistencia a la degradación enzimática sin comprometer su actividad biológica (Bello y col., 2019; Rocamora y col., 2023).

En resumen, los fármacos biológicos glicosilados son más estables y menos propensos a la agregación y desnaturalización que sus contrapartes no glicosiladas (Kayser y col., 2011; Rocamora y col., 2023).

3.1.1.2.2. Efecto sobre la actividad biológica

La glicosilación puede modular las funciones de una proteína y su afinidad por moléculas de unión, como otras proteínas, sustratos o ligandos (Bello y col., 2019). Su efecto sobre la actividad biológica varía según el contexto experimental: en algunos casos la potencia y en otros la reduce.

En ensayos *in vitro*, la glicosilación incide principalmente en la interacción de la proteína con su ligando o receptor. Si bien en algunos casos la ausencia de oligosacáridos incrementa la actividad biológica específica, en otros, la carencia de azúcares produce una disminución de la misma. Por ejemplo, en el caso del hIFN- β -1a, la eliminación de glicanos reduce su actividad antiviral, posiblemente por agregación (Dissing-Olesen y col., 2008). En contraste, en otras proteínas como el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humano (hGM-CSF), la forma totalmente glicosilada presenta una actividad mucho menor que la versión no glicosilada producida en bacterias (Scapin y col., 2024).

En el contexto *in vivo*, además de la interacción con el receptor, la vida media en circulación cobra importancia. Aunque en general un mayor grado de glicosilación y contenido de azúcares mejora las propiedades farmacocinéticas y, por ende, la actividad biológica (Solá y Griebenow, 2010), existen casos que escapan a dicha generalización. Por ejemplo, el G-CSF glicosilado estimula más la proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas que la versión no glicosilada (Ataergin y col., 2008), mientras que la actividad de la interleuquina 4 (IL-4) no se altera tras cambios en su glicosilación, como consecuencia del tratamiento con N-glicosidasa (Scapin y col., 2024).

Para muchas proteínas, una glicosilación completa se asocia con la máxima actividad biológica, aunque en otros casos el estado de glicosilación tiene un impacto limitado. En algunas situaciones, sólo un tipo específico de glicosilación influye en la actividad; por ejemplo, en la hEPO, la eliminación de todos los N-glicanos reduce su actividad *in vivo*, mientras que la remoción de los O-glicanos no afecta estas propiedades (Albrecht y col., 2014).

3.1.1.2.3. Efecto sobre la antigenicidad e inmunogenicidad

La glicosilación puede interferir en la antigenicidad e inmunogenicidad de las proteínas de dos maneras opuestas: actuando en algunos casos como un mecanismo atenuante y en otros, como un potenciador de la respuesta inmune.

Por un lado, puede reducir la inmunogenicidad al enmascarar sitios antigénicos o epitopes, reduciendo la respuesta inmune al actuar como un escudo frente al sistema inmunitario. Además, durante el procesamiento de la proteína por parte de las células presentadoras de antígeno, la glicosilación puede interferir en la interacción entre el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y el receptor de células T (TCR), lo que puede suprimir la activación de linfocitos T. También, como se mencionó en el inciso 3.1.1.2.1, los glicanos pueden reducir la agregación y la desnaturalización de la proteína, fenómenos que suelen asociarse a un aumento de la inmunogenicidad tanto *ex vivo* como *in vivo* (Mufarrege y col., 2017; Rosenberg y Sauna, 2018). Estos efectos han sido evidenciados en diversos estudios. Por ejemplo, la ausencia de O-glicosilación en el hGM-CSF resultó en un aumento de la antigenicidad, lo que resalta el rol de los O-glicanos en el enmascaramiento de sitios potencialmente antigénicos en la cadena principal de la proteína (Albrecht y col., 2014). De manera similar, variantes hiperglicosiladas de IFN-alfa humano recombinante (rhIFN- α), mostraron inmunogenicidad reducida en comparación con el IFN-*wild type* humano recombinante (IFN-wt de ahora en adelante), lo que pone de manifiesto que un mayor grado de glicosilación puede contribuir a disminuir la respuesta inmune (Gugliotta y col., 2021).

Por otro lado, la glicosilación también puede inducir inmunogenicidad. En ciertos casos, estructuras glicosídicas específicas pueden formar parte del epítipo o facilitar la presentación

antigénica. Algunos oligosacáridos pueden ser antigénicos o inmunogénicos por sí solos, induciendo la formación de anticuerpos anti-carbohidratos, mientras que otros necesitan del entorno proteico para ser reconocidos por el sistema inmune (Li y d'Anjou, 2009; Oswald y Cobb, 2018). La generación de anticuerpos neutralizantes específicos contra una proteína recombinante que se utiliza como terapéutico puede conducir a la pérdida de eficacia del tratamiento (Solá y Griebenow, 2010). Un ejemplo es el Factor VII (FVII), cuya administración pueden inducir anticuerpos anti-fármaco en un 20–30% de los pacientes. Este proceso es dependiente de células T y se han observado interacciones entre glicanos y células presentadoras de antígeno. La eliminación de un sitio de N-glicosilación en particular presente en uno de los dominios de FVII redujo significativamente su inmunogenicidad en comparación con la variante naturalmente glicosilada (Kooi y col., 2022; Qu y col., 2020; Rosenberg y Sauna, 2018).

3.1.1.2.4. Efectos sobre farmacocinética y farmacodinamia

La glicosilación desempeña un papel fundamental en la eficacia *in vivo* de las proteínas al modular el balance entre su actividad biológica y el tiempo de exposición sistémica. Estos dos aspectos están vinculados a los conceptos de farmacodinamia (PD) y farmacocinética (PK), respectivamente, y ambos son influenciados por la presencia y la estructura de los oligosacáridos que conforman las glicoproteínas. Por ello, la glicosilación resulta crítica para determinar la eficacia clínica de la proteína terapéutica (Li y d'Anjou, 2009).

La PD se centra en los mecanismos de acción del fármaco y sus efectos bioquímicos y fisiológicos. Las propiedades farmacodinámicas son amplias e incluyen las interacciones con receptores, cofactores y ligandos, así como prácticamente todas las demás actividades biológicas de una proteína (Dammen-Brower y col., 2022). La PK describe los procesos que determinan el recorrido del fármaco en el organismo: liberación, absorción, distribución, metabolización y excreción e incluye parámetros como el tiempo de vida media, el *clearance* o velocidad de depuración plasmática, el área bajo la curva (AUC), la concentración máxima y el tiempo requerido para alcanzarla. Entre estas propiedades, el tiempo de vida media en circulación es especialmente relevante, ya que determina cuánto tiempo permanece la proteína funcional en el organismo, impactando directamente en su eficacia terapéutica. Diversos estudios han demostrado que la glicosilación puede prolongar significativamente la vida media de proteínas terapéuticas como hEPO o hIFN, mejorando a su vez la actividad *in vivo* (Ceaglio y col., 2008, 2016; Fares y col., 2007, 2011; Gugliotta y col., 2019; Sales y col., 2021). Este efecto se debe principalmente a una reducción en la depuración hepática y renal, así como a una menor susceptibilidad a la degradación proteolítica (Solá y Griebenow, 2010). Una de las modificaciones más influyentes en este sentido es la sialidación terminal. La adición de residuos de ácido siálico oculta residuos de galactosa que, de otro modo, serían

reconocidos por receptores ASGPR presentes en los hepatocitos, lo que desencadenaría su rápida eliminación mediante endocitosis. De forma similar, las glicoproteínas que exponen residuos terminales de Man, GlcNAc o Fuc también pueden ser eliminadas rápidamente de la circulación debido a su reconocimiento por otros receptores tipo lectina expresados en diversos tipos celulares (Rocamora y col., 2023).

A su vez, la velocidad de filtración glomerular depende fundamentalmente del tamaño, la carga, la estructura terciaria y la masa molecular de la proteína. Las proteínas de baja masa molecular pueden evitar esta vía de depuración si presentan modificaciones, como la glicosilación, que aumenten su tamaño aparente y aporten carga negativa, principalmente a través de residuos de ácido siálico.

Es importante destacar que una alta actividad biológica *in vitro* no garantiza necesariamente una buena eficacia clínica si la proteína es rápidamente eliminada del organismo. Un ejemplo claro es la hEPO desialidada, que muestra mayor actividad *in vitro*, pero una actividad *in vivo* considerablemente menor debido a su corta vida media y a su rápido *clearance* plasmático (Jelkmann, 2002; Ma y col., 2022).

En consecuencia, evitar los mecanismos de depuración sérica mediante estrategias de glicoingeniería se ha convertido en un aspecto clave en el diseño de biofármacos. La adición o modificación de glicanos para aumentar el tamaño, la carga neta negativa o el grado de sialidación puede reducir la eliminación tanto renal como hepática, así como también incrementar la estabilidad frente a proteasas séricas.

3.1.2. Estrategias de glicoingeniería

Dado su impacto sobre las propiedades del bioterapéutico, la glicosilación ha sido reconocida como un atributo crítico de calidad (*Critical Quality Attribute, CQA*). Por ello, cobra creciente relevancia el desarrollo de estrategias de glicoingeniería orientadas a controlar y optimizar este tipo de modificaciones en las proteínas terapéuticas.

Existen diversas estrategias de glicoingeniería aplicables a las proteínas terapéuticas, y continuamente surgen nuevas alternativas. En términos generales, podemos agrupar estas estrategias según el método de producción utilizado:

a) Glicoingeniería *in vivo*: Estas estrategias pueden subdividirse en:

- **Ingeniería celular:** incluye aquellas que modifican el sistema de expresión. En los últimos 30 años, se han desarrollado numerosos métodos para modificar células de mamíferos, plantas, insectos, levaduras, bacterias, entre otros organismos, con el fin de expresar proteínas con patrones de glicosilación específicos. La complejidad de estas modificaciones varía según el organismo utilizado y el perfil de glicosilación deseado.

En general, las estrategias buscan alterar el contenido, la heterogeneidad y la ramificación de glicanos. Para ello, se emplean tecnologías de eliminación génica (*knockout*), reducción

(*knockdown*), sobreexpresión, mutagénesis, inhibición con pequeñas moléculas, e inserción (*knock-in*) de genes que codifican enzimas humanas ausentes en el sistema de expresión. Estas intervenciones permiten modificar el tipo y la concentración de glicosidasas, glicosiltransferasas, enzimas metabólicas y transportadores, alterando así los patrones de glicosilación de las proteínas expresadas (Ma y col., 2020).

Algunos ejemplos concretos de ingeniería celular incluyen la generación de líneas celulares deficientes en GDP-fucosa o con menor expresión de la fucosiltransferasa FUT8, lo que permite obtener anticuerpos hipofucosilados. Para mejorar la sialidación, se ha evaluado la expresión transitoria de enzimas involucradas en la maquinaria de sialidación, el uso de inhibidores de sialidasas (Lalonde y Durocher, 2017) y la sobreexpresión del transportador de CMP-Neu5Ac en células de mamífero. También se ha evaluado el incremento del número de residuos terminales como la Gal, que sirven de base para una mayor sialidación (Xian y Moh, 2018). Para mejorar la ramificación de los N-glicanos, se ha recurrido a la sobreexpresión de las enzimas responsables de generar estructuras bi-, tri- y tetraantenarias. También se han desarrollado líneas celulares modificadas que no producen Fuc, Gal o que expresan glicanos biantenarios homogéneos (Tejwani y col., 2018). Estas modificaciones apuntan a intervenir en las etapas del Golgi medial y trans, donde ocurre la ramificación y extensión de las cadenas de glicanos.

Diversos tipos de células no mamíferas, como plantas, insectos, levaduras y bacterias, han sido empleados en glicoingeniería para producir glicoproteínas con estructuras definidas. Aunque suelen generar glicanos distintos a los humanos, estos sistemas han sido modificados para minimizar su complejidad, controlar la ramificación o introducir rutas humanas específicas, como la O-glicosilación tipo mucina (Dicker y Strasser, 2015; Geisler y col., 2015; Ma y col., 2020; Van Landuyt y col., 2019). En particular, debido a que las bacterias exhiben interés por su bajo costo y facilidad de manipulación, lo que ha impulsado el desarrollo de estrategias para humanizar sus vías de glicosilación y reducir la heterogeneidad (Du y col., 2019; Harding y Feldman, 2019; Hoffmanns y col., 2025).

En este contexto, también se destaca la glicoingeniería metabólica, que consiste en modificar las concentraciones de monosacáridos o nucleótidos azucarados en el medio de cultivo. Además, se han empleado otros precursores metabólicos, inhibidores de GTs, así como moduladores del pH o la temperatura del cultivo. Sin embargo, esta estrategia se ve limitada por las características del sistema de expresión, y las glicoproteínas resultantes suelen ser mezclas heterogéneas de glicofomas (Tejwani y col., 2018; Van Landuyt y col., 2019).

• **Ingeniería de proteínas:** incluye aquellas estrategias que modifican la glicoproteína objetivo. Dado que la glicosilación no está codificada directamente por el ADN, las modificaciones posibles sobre la glicoproteína nativa suelen implicar la eliminación o introducción de sitios de glicosilación. La eliminación de sitios se ha utilizado principalmente

para estudiar el papel funcional de cada uno de ellos. Un ejemplo claro es la globulina de unión a corticoides humana (hCBG), que contiene 6 sitios de N-glicosilación, pero solo uno resultó ser crucial para su correcto plegamiento, según se determinó mediante el análisis de múltiples mutantes (Sumer-Bayraktar y col., 2011).

La introducción de nuevos sitios de glicosilación difiere según se trate de N- u O-glicosilación. En el caso de la N-glicosilación, la existencia de una secuencia consenso permite la incorporación directa de nuevos sitios mediante mutagénesis dirigida. Esta estrategia requiere una planificación cuidadosa, ya que la ubicación del nuevo glicano puede afectar el plegamiento y la funcionalidad de la proteína (Tejwani y col., 2018). Para minimizar el impacto estructural y maximizar la probabilidad de conservar la actividad biológica, es común emplear herramientas *in silico* combinadas con información estructural, lo que permite diseñar racionalmente sitios de N-glicosilación con el objetivo de mantener o incluso mejorar la actividad de la proteína objetivo (Dammen-Brower y col., 2022).

Un ejemplo de esta estrategia es el diseño del rhIFN4N, una variante del interferón alfa humano (hIFN- α) en la cual se introdujeron cuatro sitios potenciales de N-glicosilación para mejorar sus propiedades farmacocinéticas. La incorporación de los glicanos se evidenció por el aumento de la cantidad de isoformas de diferente carga y un incremento de la masa molecular de 21 kDa a 30-45 kDa (Ceaglio y col., 2008) producto de una mayor macro y microheterogeneidad. Alternativamente, los sitios de N-glicosilación pueden añadirse mediante la fusión de péptidos portadores de estas secuencias, como el péptido sintético ANITVNITV, que posee dos sitios potenciales de N-glicosilación. Su fusión al hIFN- α y a la hormona foliculoestimulante (FSH) resultó en un incremento de la masa molecular de ambas proteínas, acompañado de una mejora en sus propiedades farmacocinéticas (Gugliotta y col., 2019; Perlman y col., 2003).

En contraste, debido a la ausencia de una secuencia consenso, la incorporación de sitios de O-glicosilación debe realizarse mediante la fusión de un péptido que contenga residuos potencialmente susceptibles a O-glicosilación. Existen péptidos naturales, entre los cuales se encuentran roTagO y OG-tag, de 13 y 10 aminoácidos respectivamente, que contienen un sitio de O-glicosilación y se han utilizado para estudiar el tráfico de glicoproteínas a través del aparato de Golgi (Petris y col., 2014). El péptido natural más ampliamente conocido es el CTP (*Carboxy-Terminal Peptide*), que deriva de la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG, del inglés *human chorionic gonadotropin*) y ha sido utilizado como etiqueta de fusión en diversas proteínas, mejorando significativamente sus propiedades farmacocinéticas (Ceaglio y col., 2016; Fares y col., 2007, 2010; Furuhashi y col., 1995; Lapolt y col., 1992). También existen péptidos sintéticos, como el GALaXy®, formado por 5 aminoácidos y un sitio de O-glicosilación, que permite la producción de proteínas recombinantes con O-glicosilación sitio-específica y uniforme (Murray y col., 2021).

b) Glicoingeniería *in vitro* (IVGE): Estos métodos permiten modificar estructuras de glicanos o glicoproteínas en condiciones controladas, fuera del entorno celular. Su principal ventaja es la capacidad de generar glicofomas homogéneas y bien definidas, en un ambiente donde parámetros como temperatura, concentración de sustratos/cofactores y tiempo de reacción son regulables (Ma y col., 2022). Estas estrategias pueden agruparse en 3 subcategorías:

- **Síntesis química de la glicosilación proteica:** se refiere al uso de compuestos sintéticos para modificar estructuras glicosiladas o introducir azúcares artificiales en las proteínas. Incluye la síntesis química de glicanos definidos y su posterior conjugación química a proteínas para obtener glicoproteínas homogéneas y químicamente definidas (Ma y col., 2020). Esta estrategia brinda flexibilidad y gran precisión estructural, ya que permite controlar la posición, cantidad y tipo de glicosilación. Sin embargo, es laboriosa, involucra múltiples pasos críticos, está limitada por la disponibilidad de materiales iniciales esenciales y poco adecuada para producción a gran escala (Xian y Moh, 2018).

- **Modificación enzimática de glicoproteínas:** Conocida también como glicoingeniería basada en bioquímica, implica el uso de glicosidasas y GTs para remover o agregar monosacáridos específicos sobre glicoproteínas purificadas. El remodelado con enzimas hidrolíticas (para eliminar estructuras indeseadas) es simple, escalable y rentable. Por el contrario, el remodelado con transferasas (para agregar estructuras deseadas) es más complejo, dado que requiere sustratos glicosilados activos (Van Landuyt y col., 2019). Es un enfoque eficiente para lograr un cierto tipo, estructura o característica de glicano, reestructurar los preexistentes y estudiar el impacto de modificaciones específicas (Ma y col., 2020).

- **Síntesis quimioenzimática de glicoproteínas:** Combina lo mejor de los enfoques anteriores: la síntesis química de péptidos/glicanos y las reacciones enzimáticas para modificar glicoproteínas, unidos por ligación química. Una ventaja de esta estrategia es la simplificación del proceso en comparación con la síntesis totalmente química que puede resultar muy compleja y lenta o totalmente bioquímica que presenta limitaciones con la selectividad del sitio (Xian y Moh, 2018).

3.1.3. Factores que influyen sobre la glicosilación

La glicosilación constituye uno de los CQA fundamentales en proteínas terapéuticas recombinantes, por lo que debe ser cuidadosamente preservada. Dada la heterogeneidad inherente de los perfiles de glicanos y el riesgo de generar estructuras glicosídicas no humanas con potencial inmunogénico, el perfil glicosídico debe ser considerado y controlado a lo largo de todo el proceso de producción de glicoproteínas.

Como se mencionó anteriormente, las principales estrategias para controlar la glicosilación de glicoproteínas incluyen técnicas de glicoingeniería tanto *in vivo* como *in vitro*. Sin embargo, la

optimización de las condiciones de cultivo, como la composición del medio, el pH, la agitación y la suplementación, representa una acción clave que impacta significativamente en el perfil de glicanos (Ivarsson y col., 2014). Diversos parámetros del cultivo pueden ser manipulados para optimizar el crecimiento celular y la productividad; sin embargo, estos cambios también pueden modificar las características glicosídicas del producto final, por lo que resulta esencial conocer y controlar su impacto (Butler, 2004; Costa y col., 2014; Albrecht, y col., 2014).

Los factores que influyen sobre la glicosilación pueden ser divididos en tres categorías:

- **Medios de cultivo y nutrientes:** determinan el crecimiento celular y, en consecuencia, tienen gran influencia sobre la calidad del producto final. Los medios para células animales suelen contener una combinación de componentes químicamente definidos y no definidos. La glucosa es la principal fuente de energía; condiciones con glucosa limitada pueden derivar en glicoproteínas con alteraciones glicosídicas. La glutamina es una fuente adicional de energía y un precursor clave en la síntesis de nucleótidos. Sin embargo, su metabolismo genera amonio, que puede acumularse en el medio afectando la viabilidad celular y la glicosilación de proteínas, disminuyendo la incorporación de ácido siálico terminal (Fan y col., 2015).

La suplementación con suero animal ha sido históricamente esencial para la proliferación celular, pero presenta importantes desventajas como variabilidad entre lotes, dificultad en los procesos de purificación, costos elevados y riesgo de transmisión de patógenos. Por esta razón, la industria biotecnológica promueve cada vez más el uso de medios químicamente definidos y libres de suero. Las líneas celulares adaptadas a estas condiciones permiten procesos de producción más controlados, seguros y rentables, pero el proceso de adaptación puede impactar tanto en la productividad como en el perfil de glicosilación de la proteína recombinante (Costa y col., 2014).

- **Condiciones de cultivo:** deben ser optimizadas para maximizar la productividad y mantener un perfil de glicosilación consistente. Parámetros como la concentración de O₂ disuelto, la temperatura, el pH y el nivel de CO₂ tienen efectos significativos sobre la glicosilación. El O₂ presenta un rol importante en el metabolismo y viabilidad celular, e influye en la glicosilación de manera dependiente de la línea celular y de la proteína, afectando especialmente la galactosilación y la sialidación. El pH, cuyo control está regulado por el CO₂, también afecta la incorporación de Gal y ácido siálico e incluso tiene cierta influencia en el grado de ocupación de los sitios potenciales de glicosilación (Aghamohseni y col., 2014). Por otra parte, se ha observado que la reducción de la temperatura del cultivo a valores menores de 37 °C puede incrementar la productividad y modificar los niveles de sialidación de las proteínas (Costa y col., 2014).

- **Modos de operación del cultivo:** los sistemas de cultivo más utilizados son *batch*, *fed-batch* y perfusión. En sistemas *batch*, los nutrientes se agotan progresivamente, por lo que las condiciones del medio cambian durante el proceso y pueden alterar el perfil glicosídico

del producto acumulado. En modo *fed-batch*, los nutrientes se agregan de forma controlada, lo que permite alcanzar mayores densidades celulares; sin embargo, el producto permanece en el biorreactor y puede sufrir modificaciones por la acción de enzimas secretadas o liberadas por lisis celular, como glicosidasas o proteasas. En contraste, en los sistemas de perfusión, el tiempo de residencia de la glicoproteína en el biorreactor es mucho menor, gracias a la renovación continua del medio, lo que reduce la heterogeneidad de las glicofomas y contribuye a obtener un producto de mayor calidad. Por otra parte, aunque existen procesos que se llevan adelante en condiciones de adherencia, se prefiere adaptar las células al cultivo en suspensión, ya que facilita su escalabilidad y permite prescindir del uso de suero (Costa y col., 2014).

Finalmente, es importante destacar que el patrón de glicosilación depende intrínsecamente del sistema de expresión utilizado. Diversas líneas celulares de mamíferos son capaces de sintetizar glicanos similares a los humanos. Entre ellas, las células CHO (*Chinese Hamster Ovary*) son las más ampliamente utilizadas para la producción de glicoproteínas terapéuticas, ya que poseen una maquinaria de glicosilación compatible. Sin embargo, pueden generar estructuras no humanas, como el epítipo α -Gal y el ácido N-glicolilneuramínico (NGNA), que podrían inducir respuestas inmunogénicas (Ghaderi y col., 2010; Mastrangeli y col., 2021).

En conjunto, tanto los parámetros clave del cultivo como el sistema de expresión, pueden impactar significativamente en el patrón de glicosilación de una proteína terapéutica. Lograr un perfil de glicosilación adecuado es esencial, ya que influye en la eficacia, la inmunogenicidad, la estabilidad y la actividad biológica de la proteína, afectando no solo el rendimiento del proceso sino también el costo de desarrollo y el éxito clínico del bioterapéutico (Gupta y Shukla, 2018).

4. ESTRATEGIAS PARA LA PURIFICACIÓN DE BIOTERAPÉUTICOS

La obtención de proteínas recombinantes con alto grado de pureza es un requisito fundamental para su caracterización bioquímica y la evaluación de su función biológica. Por ello, es indispensable contar con estrategias de purificación eficaces que permitan separar la proteína de interés de impurezas, isoformas mal plegadas y otros componentes del sistema de expresión. En el caso de las proteínas terapéuticas, la eficiencia del proceso de purificación es crítica no solo para preservar su actividad, sino también para garantizar su seguridad y eficacia, cumpliendo con los estándares regulatorios exigidos para su uso clínico. Sin embargo, la falta de metodologías eficientes continúa siendo uno de los principales desafíos, ya que el procesamiento *downstream* puede representar entre el 50 % y el 80 % del costo total de fabricación (Ren y col., 2020).

Actualmente, la mayoría de los procesos de purificación de proteínas terapéuticas se basa en técnicas cromatográficas, consideradas el estándar de oro del sector biofarmacéutico debido

a su alta resolución, robustez y elevados niveles de recuperación. Aunque se han desarrollado métodos de separación no cromatográficos —como la precipitación, la cristalización o la separación en sistemas acuosos bifásicos—, la cromatografía sigue siendo el pilar de la industria biofarmacéutica debido a su versatilidad y eficacia (Rathore y col., 2018). A pesar de que contribuye significativamente al costo total de producción de un biofármaco, los procesos cromatográficos continúan siendo ampliamente preferidos porque ofrecen ventajas únicas en términos de especificidad para la captura y una mayor capacidad para eliminar impurezas en comparación con otras alternativas (Sánchez-Trasviña y col., 2021).

La cromatografía permite aislar, clasificar y extraer los componentes de una mezcla para su análisis cualitativo y cuantitativo. La separación se realiza sobre la base de propiedades fisicoquímicas como el tamaño y forma, la carga total, la hidrofobicidad superficial o la afinidad por ligandos específicos. Entre las estrategias más utilizadas para la purificación de proteínas se encuentran:

- **Cromatografía de intercambio iónico**, que separa proteínas según su carga neta.
- **Cromatografía de interacción hidrofóbica**, que separa en función de diferencias en la hidrofobicidad superficial de las proteínas.
- **Cromatografía de exclusión por tamaño**, que discrimina según el tamaño molecular el cual se relaciona con la forma y masa molecular de las proteínas.
- **Cromatografía de afinidad**, que permite una captura específica basada en interacciones altamente selectivas con un ligando inmovilizado.

Estas técnicas se basan en principios biofísicos generales, como la adsorción (interacción líquido-sólido), la partición (interacción líquido-líquido), la exclusión estérica y la afinidad molecular. Mientras que los métodos cromatográficos basados en partición son más eficaces para separar pequeñas moléculas como aminoácidos, carbohidratos o ácidos grasos, la purificación de macromoléculas como las proteínas requieren sistemas más específicos, como los que se basan en afinidad (Ramraje y col., 2020) para obtenerlas con elevada pureza en pocos pasos.

El proceso de purificación suele dividirse en tres etapas secuenciales: captura, para eliminar impurezas mayoritarias y concentrar la proteína de interés; intermedia, para enriquecer el producto y reducir variantes no deseadas; y pulido, para eliminar trazas de contaminantes o isoformas no deseadas. La selección y combinación adecuada de estas técnicas, junto con la optimización de las condiciones operativas, resulta esencial para maximizar el rendimiento y la pureza del producto final (Sánchez-Trasviña y col., 2021).

No obstante, los métodos cromatográficos convencionales también presentan limitaciones. Algunos complejos multiproteicos son inestables frente a condiciones extremas de pH o fuerza iónica, requeridas en técnicas como el intercambio iónico o la interacción hidrofóbica. Además, un solo paso raramente es suficiente para alcanzar los niveles de pureza requeridos en

proteínas terapéuticas, por lo que suele ser necesario implementar múltiples etapas de purificación, lo que incrementa la complejidad, el tiempo y el costo del proceso (Tomomori-Sato y col., 2013).

En este contexto, la cromatografía de afinidad ha emergido como una de las estrategias más eficaces, gracias a su alta especificidad y capacidad para obtener proteínas funcionales en condiciones más suaves, con niveles elevados de pureza y rendimiento en un solo paso. Si bien no existe una técnica universal para abordar la diversidad de proteínas, la afinidad se ha consolidado como una herramienta versátil y potente en etapas iniciales del proceso. En particular, la incorporación de etiquetas (*tags*) de afinidad en el diseño de la proteína permite establecer interacciones altamente selectivas con ligandos inmovilizados, minimizar pérdidas durante la purificación y simplificar el proceso al reducir la cantidad de etapas necesarias para cumplir con los estándares regulatorios (Gomari y col., 2020).

4.1. Uso de etiquetas como sistemas de afinidad

Uno de los principales avances en los sistemas de purificación por afinidad ha sido el desarrollo de etiquetas de afinidad o *affinity tags*, secuencias específicas de aminoácidos que se fusionan genéticamente a la proteína de interés. Estas etiquetas permiten el aislamiento eficiente de proteínas, incluso en ausencia de información previa sobre sus propiedades bioquímicas, gracias a su capacidad para reconocer y unirse de forma específica a ligandos inmovilizados en matrices sólidas (Yadav y col., 2016). Esta interacción puede establecerse con una amplia gama de sustratos, incluyendo carbohidratos, biomoléculas pequeñas, agentes quelantes de metales o anticuerpos de alta especificidad, lo que mejora la recuperación y el rendimiento, alcanzando altos niveles de pureza independientemente de la estructura de la proteína blanco o del sistema de expresión empleado (Freitas y col., 2022). El tamaño de las etiquetas puede variar desde menos de 1 kDa hasta aproximadamente 55 kDa, clasificándose en dos categorías principales:

- **Etiquetas peptídicas:** son secuencias cortas de 6 a 30 aminoácidos que se insertan en el extremo N o C de la proteína. Debido a su pequeño tamaño, es menos probable que alteren la estructura o la función de la proteína blanco y, en general, pueden eliminarse fácilmente mediante clivaje proteolítico si se considera necesario. Sin embargo, si se colocan en posiciones inapropiadas, pueden interferir con su estructura, función o interacciones (Petris y col., 2014).
- **Etiquetas proteicas:** presentan mayor tamaño (hasta 55 kDa) y derivan de dominios proteicos, cadenas polipeptídicas o incluso enzimas completas. Se fusionan al extremo N o C de la proteína y, además de facilitar la purificación, pueden mejorar su expresión, solubilidad y plegamiento. Aun así, su gran tamaño puede interferir con la función biológica, por lo que pueden requerir su eliminación tras la purificación (Fujii y col., 2016).

Un buen *tag* de fusión debe cumplir con las siguientes propiedades:

- (i) Versatilidad, es decir, capacidad de fusionarse con una amplia variedad de proteínas recombinantes.
- (ii) Compatibilidad estructural, para no interferir con el correcto plegamiento de la proteína objetivo, permitiendo así su conformación biológicamente activa.
- (iii) Remoción controlada, de ser necesario, permitiendo su sencilla liberación de la proteína ya sea mediante clivaje químico o enzimático, generalmente mediante proteasas específicas que reconocen secuencias de corte introducidas en el *linker* entre la etiqueta de fusión y la proteína (Yadav y col., 2016). Cabe mencionar la remoción de una etiqueta solo es necesaria cuando afecta negativamente la función o estabilidad de la proteína de interés.

El éxito de estas estrategias depende de una correcta elección del *tag* según la aplicación, considerando factores como la compatibilidad con la proteína blanco, el sistema de expresión, el método de purificación y la posibilidad de requerir su eliminación.

En las últimas décadas, se han desarrollado numerosos péptidos de fusión, entre ellos Strep-tag II®, una secuencia pequeña de 8 aminoácidos, derivada de un péptido bacteriano que se une con alta especificidad a la estreptavidina; y *calmodulin-binding peptide* o CBP *tag*, una secuencia de 26 aminoácidos derivada de una quinasa, que se une con alta afinidad a la calmodulina en presencia de Ca^{2+} (Yadav y col., 2016). Por otro lado, ejemplos de etiquetas proteicas incluyen MBP (*Maltose Binding Protein*), una proteína de 42 kDa que mejora la solubilidad y expresión de proteínas propensas a la agregación, y facilita la purificación por afinidad con columnas de amilosa; GST (*Glutathione S-Transferase*), una proteína de 26 kDa que solubiliza proteínas y permite la purificación por afinidad usando glutatión inmovilizado; CaM (calmodulina), empleada como etiqueta de afinidad, permite la unión específica a un dominio de unión a calmodulina inmovilizado en presencia de Ca^{2+} , con elución controlada mediante EDTA (Lin y col., 2018); y 1BKR (13 kDa) y 2GKG (14 kDa), dominios derivados de la β -espectrina humana y de la proteína FrzS de *Myxococcus xanthus*, respectivamente, que han demostrado aumentar la solubilidad de proteínas modelo expresadas de forma insoluble en bacterias (Halawa, 2019).

Debido a sus características únicas, el uso de etiquetas de afinidad se ha consolidado como una estrategia poderosa para el desarrollo de sistemas de separación y recuperación de proteínas recombinantes incluso, a gran escala (Freitas y col., 2022; Yang y col., 2018).

4.1.1. Uso de etiquetas con epitopes peptídicos o *epitope tagging*

El etiquetado con epitopes peptídicos (también denominado *epitope tagging*) consiste en fusionar la proteína de interés con una secuencia corta reconocida por un anticuerpo específico. Esto permite su detección y purificación mediante IAF hacia el epitope introducido, en contraste con la IAF convencional, que requiere generar anticuerpos específicos para cada

proteína nativa (Moser y Hage, 2010; Tomomori-Sato y col., 2013). Sin embargo, obtener anticuerpos con la especificidad y afinidad adecuadas para cada proteína a purificar no siempre es factible, lo que limita el uso generalizado de la IAF tradicional (Brizzard, 2008).

Como alternativa, el *epitope tagging* emplea secuencias peptídicas cortas y bien definidas que se adicionan en el extremo N o C de la proteína de interés, sin interferir significativamente con su estructura o función y que pueden ser reconocidas por anticuerpos o por moléculas más pequeñas con capacidad de reconocimientos antigénico como los *nanobodies* (nanocuerpos) ampliamente caracterizados con alta afinidad y especificidad anti-epitope. Este enfoque ha sido particularmente útil para el estudio de proteínas desconocidas, nuevas o escasamente caracterizadas, permitiendo su detección y purificación incluso en ausencia de anticuerpos específicos (Choi y col., 2017; Ren y col., 2020).

Entre los sistemas más utilizados se encuentra ALFA-tag®, una pequeña etiqueta de 13 aminoácidos que forma una hélice α estable en el extremo de la proteína a la cual se fusiona. Es reconocida por el nanocuerpo NbALFA que se une a proteínas etiquetadas con ALFA con una afinidad en el rango picomolar, lo que permite su purificación en un solo paso bajo condiciones fisiológicas (Götzke y col., 2019). Otro ejemplo es PepTag, reconocida por el nanocuerpo PepNB; esta etiqueta no interfiere con el plegamiento ni con la localización celular y se ha aplicado en múltiples contextos (Traenkle y col., 2020). También pueden mencionarse Rho1D4®, utilizada para proteínas de membrana por su alta especificidad; c-Myc, de 11 aminoácidos, muy específica pero costosa y con dificultades en la elución; HA tag (hemaglutinina), de 9 aminoácidos, versátil pero con potenciales efectos negativos sobre el plegamiento o la función proteica; y FLAG® tag, pequeña (8 aminoácidos), hidrofílica, y accesible para anticuerpos y proteasas, que permite una purificación eficiente, aunque limitada por su elevado costo y las posibles modificaciones postraduccionales que pueden interferir con la unión (Yadav y col., 2016).

También se ha desarrollado la IAF TAP, en la que la proteína diana contiene al menos dos etiquetas de epitopes diferentes. Un ejemplo es el uso combinado de los *tags* HA-FLAG, que permite una inmunoprecipitación secuencial: primero con un anticuerpo contra una de las etiquetas, seguida de una elución competitiva, y luego una segunda purificación con un anticuerpo contra el segundo epitope (Decaprio y Kohl, 2019).

Aunque existen numerosos sistemas comerciales, persisten desafíos relacionados con la compatibilidad estructural entre la etiqueta y la proteína blanco, la facilidad de obtención y clonación de los anticuerpos correspondientes, y la versatilidad del sistema para aplicaciones adicionales como *western blot*, citometría de flujo, inmunoprecipitación o estudios de localización intracelular. La elección adecuada del par epitope-anticuerpo es esencial para optimizar no solo la purificación, sino también la caracterización funcional de proteínas recombinantes.

4.1.2. Sistemas de elución

Los enfoques más comunes para la elución en sistemas de afinidad incluyen el cambio de pH de la fase móvil o la adición de agentes caotrópicos. Otros métodos menos frecuentes consisten en el uso de agentes competidores, modificadores orgánicos, agentes desnaturizantes o la modificación de la temperatura durante la elución. Usualmente, la solución de elución se aplica en forma de gradiente escalonado, aunque también pueden usarse gradientes continuos o no lineales.

El cambio de pH es el método más ampliamente utilizado para liberar compuestos retenidos en columnas de afinidad, generalmente empleando soluciones ácidas (pH 1–3). Las condiciones alcalinas, en cambio, suelen ser menos eficientes. Una dificultad asociada al uso de pH extremos es la posible desnaturización de los anticuerpos inmovilizados o de las moléculas retenidas, lo que puede comprometer la utilidad de la resina.

Como alternativa para evitar estos efectos, se pueden incorporar agentes caotrópicos como tiocianato (SCN^-), perclorato (ClO_4^-), yoduro (I^-) o cloruro (Cl^-) a la solución de elución. En concentraciones entre 1,5 y 8 M han demostrado ser eficaces para disociar complejos anticuerpo–antígeno de alta afinidad.

En todos los casos, es importante considerar el impacto de las condiciones de elución sobre la integridad de la resina y de la proteína retenida (Moser y Hage, 2010).

5. BIOTERAPÉUTICOS COMO PROTEÍNAS MODELO

Para evaluar nuevas estrategias de diseño y optimización de bioterapéuticos resulta fundamental seleccionar proteínas modelo que representen plataformas relevantes para la industria y permitan validar mejoras en un contexto real. En este sentido, es importante considerar proteínas con amplia caracterización estructural y funcional, relevancia clínica comprobada y limitaciones conocidas que justifiquen su mejora, tales como vida media corta, necesidad de administración frecuente o problemas de estabilidad e inmunogenicidad. Es ventajoso, además, elegir proteínas para las que existan ensayos robustos de actividad, estabilidad, agregación y farmacocinética, lo cual facilita la evaluación del impacto de la estrategia desarrollada. La inclusión de moléculas pertenecientes a diferentes clases terapéuticas —por ejemplo, citocinas, hormonas o factores de crecimiento— permite explorar el alcance de la estrategia en contextos diversos de estructura, glicosilación y mecanismos de acción. Este enfoque asegura que los resultados obtenidos no solo sean reproducibles y comparables, sino también extrapolables a un espectro más amplio de proteínas recombinantes de interés biomédico.

En concordancia con estos criterios, en este trabajo de tesis se seleccionaron dos proteínas aprobadas como bioterapéuticos, ampliamente caracterizadas y respaldadas por una extensa

literatura, lo que facilita su comparación con el desarrollo de nuevas muteínas. Estas proteínas son: hIFN- α 2b y hEPO.

5.1. Interferón como proteína modelo

Las citoquinas constituyen una familia de proteínas secretadas que regulan una amplia variedad de procesos fisiológicos, especialmente aquellos vinculados con la inmunidad innata y adaptativa. Se han identificado más de 130 citocinas, clasificadas en seis superfamilias que incluyen ILs (o citoquinas de clase I), IFNs (citoquinas de clase II), quimiocinas, factores estimulantes de colonias (CSFs), factores de necrosis tumoral (TNFs) y factores de crecimiento transformante (TGFs). Dada su implicancia en diversas patologías, las citoquinas integraron la primera generación de inmunoterapias utilizadas para tratar cánceres y enfermedades autoinmunes (Aung y col., 2023).

Desde la aprobación de estas terapias iniciales, se ha intentado desarrollar múltiples estrategias para diseñar fármacos basados en citoquinas mediante ingeniería de proteínas, abarcando desde diversos enfoques estructurales guiados y diseños *in silico*, hasta estrategias de administración dirigida del fármaco y extensión de su vida media mediante conjugación o fusión. Entre los biofármacos más prometedores se encuentran los interferones, aprobados para uso clínico en humanos casi treinta años después de su descubrimiento (Castro y col., 2021). Estas moléculas poseen múltiples propiedades biológicas que aún no se comprenden por completo, por lo que su estudio y el desarrollo de variantes mejoradas continúan en vigencia en nuestros días (Kiladjian, 2024).

5.1.1. Tipo de Interferones

El IFN fue la primera citoquina descrita, identificada por Isaacs y Lindenmann en 1957 como un factor secretado por células infectadas por virus que interfería con la replicación viral (Kiladjian, 2024). Los IFNs constituyen un grupo numeroso y heterogéneo de glicoproteínas, con una masa molecular que oscila entre 5 y 50 kDa, sintetizadas por distintos tipos de células eucariotas en respuesta a diversos estímulos, tales como virus, bacterias, hongos, protozoarios, otras citoquinas, mitógenos y ARN de cadena simple o doble, entre otros (Castro y col., 2021; Ramos y col., 2021).

La familia de los IFNs está compuesta por al menos 13 especies, que, dependiendo de sus propiedades, su capacidad para unirse a receptores celulares y sus secuencias aminoacídicas, se clasifican como tipo I (o viral), tipo II (o inmune) y tipo III (Karakoese y col., 2023; Zhang y col., 2020). Los IFNs tipo I comprenden múltiples subtipos de IFN- α , un solo IFN- β , y otros subtipos menos caracterizados como IFN- ϵ , - κ , - ω , - ν , - δ , - ζ y - τ ; aunque los últimos tres no han sido identificados en humanos (Lai y col., 2023; Pestka, 2007). Todos ellos interactúan con un receptor heterodimérico compuesto por dos cadenas polipeptídicas

transmembranas denominadas IFNAR1 e IFNAR2. Los IFN tipo II están representados exclusivamente por el IFN- γ , que se une a un receptor también heterodimérico formado por las cadenas transmembrana IFNGR1 e IFNGR2. Por su parte, los IFN tipo III contienen a IFN- λ 1, - λ 2, - λ 3 y - λ 4 y actúan a través de un receptor heterodimérico compuesto por las subunidades IFNLR1 e IL-10R2. Tanto los IFNs tipo I como los de tipo III activan las mismas vías antivirales, aunque lo hacen mediante receptores distintos (Fig. 6) (de Weerd y col., 2024; Moreau y col., 2023; Zhang y col., 2020).

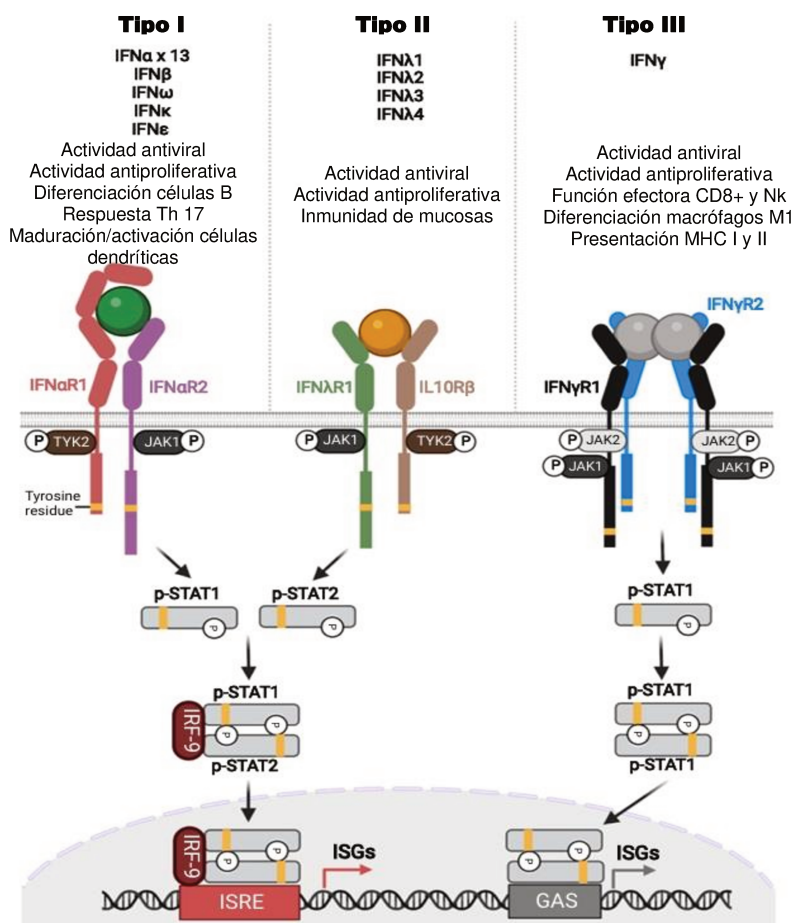


Figura 6: Vía de señalización del IFN. Los IFN de tipo I, II y III desencadenan la vía intracelular JAK/STAT.

En particular, los IFNs tipo I son los más estudiados y ampliamente utilizados. Además, presentan el mayor potencial antiviral en comparación con los IFNs de tipo II y III. Este grupo de moléculas constituye una familia de citoquinas monoméricas de estructura α -helicoidal y tamaño pequeño (15-25 kDa), compuestas por una sola cadena polipeptídica de aproximadamente 187–208 aminoácidos, incluyendo un péptido señal de 19–24 residuos que se escinde tras su secreción, confiriéndoles múltiples funciones (de Weerd y col., 2024).

En humanos existen 18 genes diferentes que codifican a los miembros de esta familia, los cuales carecen de intrones y se encuentran localizados en el brazo corto del cromosoma 9

(de Weerd y col., 2024). Dentro de esta familia se han encontrado 13 subtipos de IFN- α humano: hIFN- α 1, hIFN- α 2, hIFN- α 4, hIFN- α 5, hIFN- α 6, hIFN- α 7, hIFN- α 8, hIFN- α 10, hIFN- α 13, hIFN- α 14, hIFN- α 16, hIFN- α 17 e hIFN- α 21, donde hIFN- α 1 e hIFN- α 13 resultan idénticos. Estos subtipos se caracterizan por una alta homología de secuencia, compartiendo entre el 76% y el 96% de los aminoácidos, lo que da lugar a plegamientos secundarios y terciarios prácticamente idénticos. No obstante, tienen funciones diferenciadas, aunque aún no se comprenden con total claridad (Lai y col., 2023; Moreau y col., 2023).

Las otras citoquinas de tipo I— IFN- β , IFN- ω , IFN- ϵ e IFN- κ — están codificadas por genes únicos. El número de genes de IFN tipo I varía entre mamíferos y, además, algunas especies presentan variantes específicas: los cerdos expresan IFN- δ ; los rumiantes, IFN- τ ; los ratones, IFN- ζ ; y los peces y anfibios, IFN- ν (Forde y Lonergan, 2017; Li y col., 2018; Pang y col., 2024).

5.1.1.1. IFN- α

Dentro de los interferones tipo I, el IFN- α es el más ampliamente estudiado debido a su diversidad genética, su potente actividad biológica y su prolongado uso clínico en diversas patologías humanas. Por estas razones, continúa siendo un modelo central para el estudio de las propiedades biológicas, terapéuticas y regulatorias de esta familia de citoquinas.

Todos los subtipos de hIFN- α son proteínas de secreción, sintetizadas como precursores de 189 aminoácidos, con excepción del hIFN- α 2, que posee 188. De ellos, 23 corresponden al péptido señal. La masa molecular teórica promedio de los subtipos de hIFN- α es de aproximadamente 18,5 kDa. Sin embargo, la masa observada por electroforesis en geles de poliacrilamida varía entre 19 y 26 kDa, diferencias atribuibles al procesamiento diferencial del extremo C y a la presencia de modificaciones postraduccionales en al menos un subtipo (de Weerd y col., 2024; Paul y col., 2015).

Solo dos subtipos de hIFN- α presentan glicosilación: el hIFN- α 14, que está N-glicosilado en la Asn72, y el hIFN- α 2, O-glicosilado en la Thr106. En los demás miembros de la familia, esta posición está ocupada por los residuos de Gly, Ile o Glu, lo que impide esta modificación (El-Baky y Redwan, 2015).

El IFN- α 2 fue el primer subtipo humano altamente activo disponible para uso científico y médico, y desde entonces se ha consolidado como el modelo de referencia, dentro de los IFN tipo I, en estudios e intervenciones clínicas (Paul y col., 2015). El locus de hIFN- α 2 comprende tres variantes alélicas: hIFN- α 2a, hIFN- α 2b e hIFN- α 2c, que difieren en los aminoácidos ubicados en las posiciones 23 y 34 (Ceaglio y col., 2010). De ellas, el hIFN- α 2b no sólo es la variante alélica predominante (las restantes se expresan en proporciones inferiores al 0,1%) sino que también es la única que contiene el residuo de Thr en la posición 106, permitiendo su O-glicosilación. Sin embargo, esta modificación no parece desempeñar un rol determinante

en la actividad biológica del hIFN- α . En la actualidad, se ha producido de manera recombinante tanto el hIFN- α 2a como el 2b (Ramos y col., 2021).

5.1.1.2. Estructura del hIFN- α

El hIFN- α 2 está compuesto por 4 hélices α (A, C, D y F), con una topología única tipo *bundle*. Estas hélices están conectadas por un bucle pronunciado (bucle AB) y tres bucles cortos (bucle BC, CD y DE). Esta organización estructural puede observarse en la Fig. 7.



Figura 7: Estructura del hIFN- α 2b (obtenida de UniProt). Se observan las hélices α y los bucles (*loops*) en color lila. En amarillo se indica la O-glicosilación, junto con las posibles posiciones alternativas que puede adoptar.

Las hélices A, C, D y F forman un haz antiparalelo de cuatro hélices. En cambio, los elementos en forma de lazo B y E presentan estructuras secundarias más variables que el resto de la proteína. En algunos casos, pueden formar hélices adicionales, y en otros, simplemente se presentan como segmentos extendidos. Estas regiones no forman parte del núcleo principal de la proteína, pero se posicionan muy cerca de él, alineándose o apoyándose a lo largo del borde del haz central. Las hélices α de los IFNs tipo I son largas, rectas y esencialmente paralelas entre sí (Karakoese y col., 2023; Walter, 2020).

El hIFN- α 2 contiene cuatro residuos de cisteína involucrados en la formación de dos puentes disulfuro, uno entre Cys1-Cys98 y otro entre Cys29-Cys138. Estos enlaces representan una de las características más conservadas de los IFN de tipo I. El primer puente mencionado no es esencial para la función, mientras que el segundo conecta el extremo N del hIFN con la hélice C y es fundamental para la actividad biológica de la proteína (Gull y col., 2013). Dentro de la molécula se han identificado tres dominios que involucran a los residuos aminoacídicos 29-35, 78-95 y 123-140. Los dominios 29-35 y 123-140 se encuentran muy próximos en el espacio, lo que facilita la formación del enlace disulfuro entre la Cys29 y la Cys138. Además, estos dos dominios comprenden el sitio de reconocimiento del receptor. El dominio restante (78-95) también participa en la unión al receptor, y, en particular, la región que abarca los

aminoácidos 81 y 95 es importante para la actividad antiproliferativa mediada por el hIFN- α (Kumaran y col., 2007).

5.1.2. Actividad biológica del hIFN- α

Los hIFN- α forman parte esencial del sistema inmune innato y desempeñan un rol central en la respuesta rápida frente a patógenos. Entre sus funciones se destacan la actividad antiviral, la modulación del sistema inmunológico, la inhibición de la proliferación celular, la acción antitumoral, la regulación de la diferenciación celular y una amplia gama de efectos inmunomoduladores. Estas citoquinas no son moléculas efectoras directas, sino que ejercen su acción al interactuar con su receptor presente en la superficie de la célula diana, desencadenando una cascada de señalización intracelular. Esta capacidad de generar efectos diversos según el contexto celular se conoce como pleiotropismo. Inducen la transcripción de genes relacionados con apoptosis, inhibición del crecimiento y activación de células inmunes innatas y adaptativas.

El hIFN- α se une inicialmente a la subunidad IFNAR2 del complejo receptor heterodimérico formando el complejo binario hIFN- α -IFNAR2. Posteriormente, se recluta IFNAR1, lo que permite iniciar la cascada de señalización. Las afinidades de unión difieren entre ambas subunidades, siendo la constante de disociación para IFNAR1 del orden de μ M, mientras que para IFNAR2 es mucho menor, en el orden de los nM (Paul y col., 2015).

Las tres funciones biológicas principales del hIFN- α incluyen:

- **Acción antiviral:** los IFNs son rápidamente inducidos y actúan en todas las etapas del ciclo viral, mediante mecanismos autócrinos y parácrinos. En las células infectadas, los IFNs promueven la apoptosis; mientras que en las células no infectadas inducen un estado antiviral que impide la replicación y diseminación de la infección viral.
- **Acción antiproliferativa:** los IFNs inhiben la proliferación de una amplia variedad de células, tanto normales como tumorales, a través de la interferencia en diferentes fases del ciclo celular que inducen el arresto en la fase G1 (Bekisz y col., 2010). La inducción de apoptosis también desempeña un rol importante en el control de la proliferación.
- **Acción inmunomoduladora:** los IFNs modulan tanto la inmunidad innata como la adaptativa, promoviendo una efectiva respuesta antiviral y aumentando la inmunovigilancia. Incrementan la expresión de moléculas del MHC de Clase I, mejorando la presentación antigénica a linfocitos T citotóxicos, y favorecen la retención de linfocitos en los ganglios linfáticos. Además, estimulan la actividad y proliferación de las células NK mediante la inducción de IL-15 en monocitos/macrófagos, y modifican el repertorio antigénico presentado por las células (Carré y col., 2025).

5.1.3. Uso clínico y comercial

Los hIFNs han sido ampliamente utilizados en diversas aplicaciones terapéuticas desde su introducción al mercado hace más de 20 años, y siguen siendo objeto activo de investigación (Zhang y col., 2020). Aunque todos los IFNs desempeñan un papel clave en la defensa contra infecciones virales, únicamente los de tipo I están aprobados clínicamente para tratar infecciones virales crónicas (Karakoese y col., 2023).

El hIFN- α 2 fue el primer subtipo de hIFN- α en ser clonado, convirtiéndose en la primera citoquina y el primer hIFN producido y comercializado por la industria farmacéutica (Paul y col., 2015). En 1986, la Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) aprobó el uso de las variantes alélicas hIFN- α 2a e hIFN- α 2b producidas en *Escherichia coli* para el tratamiento de leucemia de células vellosas, comercializadas como ROFERON-A® (rhIFN- α 2a) por Hoffmann La Roche, Inc., e INTRON-A® (rhIFN- α 2b), por Schering-Plough. Posteriormente, su uso fue extendido a otras patologías como hepatitis crónica activa B y C (HBV y HCV, respectivamente), sarcoma de Kaposi, linfoma folicular no-Hodgkin, melanoma maligno, mieloma múltiple y otros trastornos tumorales y hematológicos (Li y col., 2018). También se ha investigado su uso en enfermedades autoinflamatorias como la fiebre mediterránea familiar (FMF) (Lai y col., 2023), y en patologías emergentes como COVID-19 (Buchynskiy y col., 2023; Giorgetti y col., 2021). La administración de hIFN- α se realiza por vía parenteral —subcutánea, intravenosa o intramuscular— para evitar su degradación proteolítica. Si bien la depuración del hIFN- α depende de la vía de administración, en términos generales presenta una rápida inactivación y eliminación en fluidos y tejidos biológicos. Los niveles plasmáticos de hIFN- α alcanzan su pico entre las 4 y 10 h y regresan a niveles basales entre las 18 y 36 h, disminuyendo dentro de las primeras 24 h tras la administración (Dolin, 2014). Su catabolismo ocurre mayormente en el riñón, mediante filtración glomerular y reabsorción tubular (Katla y col., 2019; Thompson y Wakarchuk, 2022). Como consecuencia, los tratamientos requieren una administración frecuente (1 vez por día o 3 veces por semana) y dosis elevadas (aproximadamente 15 μ g) para asegurar su eficacia, lo cual se asocia a una amplia gama de efectos adversos, cuya severidad y frecuencia aumentan con la dosis y duración del tratamiento. Esto no solo compromete la eficacia terapéutica, sino también puede conducir al desarrollo de enfermedades autoinmunes, en parte por la generación de anticuerpos anti-droga, lo que limita el uso prolongado de hIFN- α (Giorgetti y col., 2021).

Tras el éxito clínico inicial del hIFN- α , se desarrollaron múltiples estrategias para mejorar su eficacia y seguridad terapéutica. Una de las más relevantes fue la pegilación, que permitió prolongar la vida media plasmática de la molécula y reducir su captación por tejidos no tumorales. Formulaciones como PEGASYS® (PEG-hIFN- α 2a) de Roche y PEGINTRON®

(PEG-hIFN- α 2b) de Schering Plough fueron aprobadas para uso clínico, permitiendo una dosificación menos frecuente (Xue y col., 2021).

En 2019 el mercado global de hIFN fue valorado en 6900 millones de dólares, y se estimó en 7500 millones en 2020, impulsado por la creciente demanda durante la pandemia de COVID-19. Actualmente, varios productos basados en hIFN se encuentran en diferentes etapas de ensayos clínicos (Castro y col., 2021). A pesar de los avances, el desarrollo de formulaciones basadas en hIFN- α continúa siendo un área activa de investigación, tanto en estudios clínicos como en nuevas plataformas terapéuticas.

5.2. Eritropoyetina como proteína modelo

La hEPO pertenece a la superfamilia de citoquinas tipo I, también conocidas como citoquinas hematopoyéticas. Presenta una masa molecular de 30-34 kDa y se encuentra en todos los invertebrados (Lv y col., 2024; Ma y col., 2022). Actualmente, se describe como una hormona glicoproteica evolutivamente conservada, secretada a la circulación para regular principalmente la eritropoyesis en respuesta a la hipoxia. Durante la vida fetal, es producida principalmente por el hígado, y tras el nacimiento, la síntesis se traslada al riñón, su principal sitio de producción en adultos (Peng y col., 2020). Su expresión génica está regulada por el factor inducible por hipoxia 2 (HIF-2) y el factor nuclear hepático 4 (HNF-4) bajo condiciones hipóxicas. En adultos, un 15-20% de la hEPO se produce en sitios extrarrenales, incluyendo hígado, bazo, médula ósea, pulmones, testículos, útero, corazón, retina y cerebro, entre otros (Ma y col., 2022), sin diferencias estructurales con la hEPO renal o hepática (Maltieri, 2018). Esta distribución ha impulsado la investigación sobre funciones no hematopoyéticas de la molécula, como su potencial efecto antioxidante, la reducción de apoptosis en células neuronales, y la protección frente al daño inducido por óxido nítrico (Hemani y col., 2021). Su actividad citoprotectora en tejidos no hematopoyéticos ha cobrado particular relevancia, despertando un creciente interés en los últimos años (Maltieri, 2018).

5.2.1. Estructura de hEPO

En humanos, el gen de la EPO se localiza en el brazo corto del cromosoma 7 y posee una longitud aproximada de 3 kpb. Su expresión da lugar a una prohormona de 193 aminoácidos, la cual, tras la remoción de una secuencia secretoria hidrofóbica de 27 residuos, se convierte en una hormona de 165 o 166 aminoácidos (Alshamsi, 2022). La hEPO natural aislada de orina humana presenta ambas formas, mientras que la hEPO producida en células recombinantes (rhEPO) contiene típicamente 165 aminoácidos (Debeljak y Sytkowski, 2012). Esta diferencia se debe a la presencia de una Arg en la posición 166, la cual es clivada por una carboxipeptidasa intracelular antes de su liberación a circulación. Como resultado, la

forma madura predominante de hEPO contiene 165 aminoácidos, aunque puede existir una pequeña fracción (1–5 %) con 166 residuos (Maltieri, 2018; Stoian y col., 2007).

La molécula contiene dos puentes disulfuro intramoleculares entre Cys7-Cys61 y Cys29-Cys33, esenciales para mantener su conformación tridimensional. La reducción de estos puentes disminuye significativamente su actividad biológica, siendo el enlace Cys7-Cys161 el de mayor incidencia. Presenta una estructura tridimensional globular, con un 50% de hélices α , dispuestas como 2 pares antiparalelos (A, B, C y D), conectados por dos bucles largos cruzados (AB y CD) y un bucle corto (BC) de cinco residuos (Fig. 8). Las hélices A y D están conectadas por el puente disulfuro Cys7-Cys161, y el bucle AB está anclado detrás del extremo C de la hélice A mediante el puente disulfuro Cys29–Cys33. Dentro de estos bucles largos, se forma un tramo corto de hojas β antiparalelas (S1: Ile39-Thr41; S2: Thr132-Ala135). Cerca del extremo C del bucle AB se encuentra un segmento α -helicoidal corto adicional (B'), que involucra los residuos Asn47-Trp51 (Ma y col., 2022).

La hEPO contiene aproximadamente un 40% de carbohidratos en masa, compuestos por tres cadenas N-glicosídicas ubicadas en Asn24, Asn38 y Asn83 y una cadena O-glicosídica en la Ser126. Los oligosacáridos N-unidos son de tipo complejo tetraantenario. La masa de la cadena polipeptídica es de aproximadamente 18 kDa, pero asciende a 34 kDa al incluir la glicosilación. La fracción de carbohidratos es requerida para la estabilidad *in vivo*, la solubilidad, la antigenicidad, y el plegamiento de la hormona, contribuyendo significativamente a la heterogeneidad estructural. En particular, los N-glicanos influyen tanto en la actividad biológica *in vivo* de la hEPO, regulando sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, como en su interacción con el receptor (Castillo y col., 2018). La hEPO es altamente heterogénea, con variaciones en los patrones de glicosilación debido a sialidación, fosforilación y O-acetilación. Estos patrones afectan directamente su eficacia terapéutica y la aparición de efectos adversos en pacientes tratados con hEPO (Guan y col., 2021).

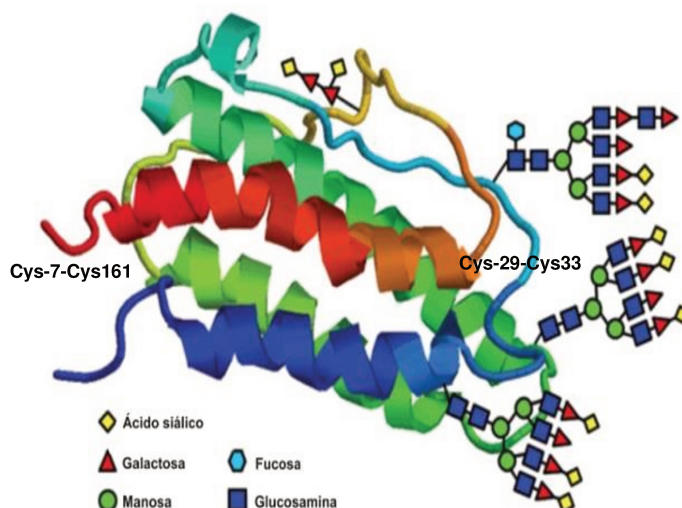


Figura 8: Estructura de la hEPO. Se observan las cuatro hélices α que la componen y una representación esquemática que ejemplifica los tres sitios de N-glicosilación en los residuos Asn24, Asn38 y Asn83 modificados con las estructuras más ramificadas y voluminosas. La restante estructura más pequeña representa el O-glicano tipo mucina modificando el residuo Ser126. El código de formas y colores ejemplifica la composición de los glicanos. Se presentan además los dos puentes disulfuro presentes en la molécula. Imagen adaptada de Maltieri (2018).

5.2.2. Actividad biológica de hEPO

Dentro de sus funciones biológicas, la más ampliamente caracterizada es la regulación de la eritropoyesis, que implica la acción sinérgica de la hEPO con otras moléculas para promover la proliferación, diferenciación y supervivencia de los progenitores celulares de linajes eritroides, y mantener así la masa de eritrocitos circulantes (Alshamsi, 2022). Ante una disminución de los niveles de oxígeno, las células intersticiales tubulares del riñón secretan hEPO a la circulación de modo endocrino. La interacción con su receptor es de alta afinidad, por lo que pequeñas cantidades circulantes de la hormona son suficientes para mantener la homeostasis de la eritropoyesis.

Sin embargo, en los últimos años, numerosos estudios han demostrado que la hEPO actúa mucho más allá del sistema hematopoyético. En situaciones de hipoxia, trauma o inflamación, muchos tejidos extrahematopoyéticos producen hEPO en las regiones periféricas que rodean los sitios lesionados, donde desempeña funciones centrales en la protección y restauración tisular. En estos contextos, la hEPO puede ejercer efectos neuroprotectores, antiapoptóticos, antioxidantes, angiogénicos y neurotróficos. En particular, promueve la supervivencia celular para retrasar la apoptosis, especialmente en el sistema nervioso central (Simon y col., 2019).

5.2.3. Uso clínico y comercial

En 1989, la FDA aprobó el uso clínico de rhEPO para el tratamiento de la anemia asociada a insuficiencia renal crónica, causada por una producción endógena insuficiente de hEPO. Su administración permitió mejoras significativas en la calidad de vida de los pacientes (Suresh

y col., 2020). Desde entonces, su uso se ha extendido al tratamiento de otros tipos de anemia inducida por causas como infecciones, quimioterapia y enfermedades inflamatorias crónicas; y también como tratamiento complementario en cirugías de trasplante, reduciendo la necesidad de transfusiones de sangre (Simon y col., 2019).

En humanos, la hEPO endógena tiene una vida media plasmática de aproximadamente 5-6 h, atribuida a su elevado grado de glicosilación. Como terapéutico, la rhEPO administrada por vía intravenosa o subcutánea presenta una vida media entre 8 y 24 h, lo que implica una rápida eliminación y baja biodisponibilidad. Como consecuencia, los pacientes requieren dosis frecuentes —dos a tres inyecciones por semana— para mantener una eficacia terapéutica adecuada. Esta limitación ha impulsado el desarrollo de nuevas variantes de rhEPO con vida media prolongada, orientadas a reducir la frecuencia de administración y mejorar la adherencia al tratamiento.

La primera rhEPO comercializada fue la hEPO- α , producida en células CHO y autorizada por la FDA en 1989, y luego en Europa y otros países bajo diferentes nombres comerciales. En 1990, se aprobó la comercialización de hEPO- β , también expresada en células CHO, con diferencias en sus patrones de glicosilación pero actividad biológica y eficacia clínica equivalentes. Durante las siguientes décadas, el uso de rhEPO se expandió rápidamente y, en 2004, la expiración de las patentes de hEPO- α y β permitió la entrada de biosimilares al mercado (Conner y col., 2020).

Con el tiempo, surgieron nuevas formulaciones recombinantes diseñadas para mejorar la farmacocinética y reducir la frecuencia de administración. En 2001 se aprobó la primera hEPO de segunda generación, conocida como darbepoetina α (o NESP, por *Novel Erythropoiesis Stimulating Protein*, Amgen), la cual presenta cinco mutaciones que permiten la adición de dos sitios adicionales de N-glicosilación y, en consecuencia, una vida media más prolongada que posibilitó una menor frecuencia de administración. Eventualmente, surgieron las variantes de tercera generación, como el activador continuo del receptor de rhEPO (CERA), conjugada a PEG, (Salamin y col., 2018), rhEPO fusionadas a fragmentos Fc de anticuerpos, a péptidos agonistas del receptor de hEPO o a CTP (Fares y col., 2007; Fares y Azzam, 2019).

Por otra parte, las propiedades neuroprotectoras, antiinflamatorias y reparadoras tisulares de la hEPO sugieren un potencial terapéutico para tratar una variedad de enfermedades (Fares y Azzam, 2019), como Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, lesiones de la médula espinal, epilepsia, hipoxia, traumatismo craneoencefálico, hemorragia subaracnoidea y accidente cerebrovascular isquémico (Ma y col., 2022; Rey y col., 2019; Simon y col., 2019). Por este motivo, se han generado nuevas variantes de rhEPO diseñadas específicamente para preservar sus efectos neuroprotectores y reparadores sin inducir eritrocitosis; no obstante, hasta el momento, ninguna de estas variantes ha sido aprobada para uso clínico.

El recorrido histórico, clínico y biotecnológico de la hEPO refleja el gran interés que esta citoquina ha despertado en el ámbito biomédico. Desde su introducción en el mercado, la rhEPO se ha consolidado como uno de los agentes terapéuticos más utilizados a nivel mundial. Su versatilidad funcional, tanto en el eje hematopoyético como en aplicaciones extrahematopoyéticas, sigue impulsando el desarrollo de nuevas formulaciones y estrategias terapéuticas.

6. DESARROLLO DE LAS ETIQUETAS GMOP Y mGMOP

Teniendo en cuenta que las etiquetas pueden emplearse tanto como herramientas de glicoingeniería como sistemas de purificación, en nuestro laboratorio se desarrollaron dos etiquetas peptídicas denominadas GMOP (*GM-CSF O-glycosylated peptide*) y mGMOP (*modified GMOP*).

Ambos péptidos derivan del hGM-CSF, una glicoproteína que posee dos sitios potenciales de N-glicosilación (N27 y N37) y cuatro de O-glicosilación (S5, S7, S9 y T10), estos últimos concentrados en el extremo N de la proteína. Aunque los glicanos no son esenciales para la actividad biológica *in vitro* de la citoquina, su presencia reduce la afinidad por el receptor. No obstante, la glicosilación contribuye a la estabilidad del hGM-CSF y, por lo tanto, prolonga su tiempo de vida media en circulación. Además, la O-glicosilación favorece el enmascaramiento de sitios de reconocimiento por parte del sistema inmune, disminuyendo la inmunogenicidad. Un análisis de los epitopes presentes en el hGM-CSF permitió describir tres, entre ellos el epitope APAR, ubicado en el extremo N de la proteína (primeros 4 aminoácidos). El mismo es reconocido por un mAb anti-hGM-CSF denominado CC1H7 (Oggero y col., 2004), obtenido de hibridomas generados a partir de ratones BALB/c inmunizados con hGM-CSF producido en *E. coli* (rhGM-CSF) (Camperi y col., 2003; Oggero y col., 2006). Estudios posteriores permitieron redefinir el epitope como APARSPS, al observar que la capacidad de unión al anticuerpo requiere, por un lado, la presencia del motivo, tal como ocurre en la proteína nativa, y por otro, el extremo N libre (Perotti y col., 2013). En este mismo trabajo se encontró que la afinidad del complejo anticuerpo-epítpe bajo condiciones no desnaturizantes es modulada por la fuerza iónica: un aumento en la concentración de sal mejora la afinidad, mientras que su ausencia la reduce. A partir de este hallazgo, se desarrolló un protocolo exploratorio de cromatografía de inmunoafinidad utilizando NaCl para favorecer la unión, alcanzando altos niveles de pureza y recuperación, cercanos al 90%. Aunque el resultado fue exitoso, no se exploró la aplicación de este enfoque en otras técnicas (Perotti y col., 2013).

Sobre esta base, y teniendo en cuenta la elevada densidad de O-glicanos en los primeros 10 aminoácidos del hGM-CSF, se diseñaron dos etiquetas peptídicas. El péptido GMOP (APARSPSPSTQPWE) corresponde directamente a la secuencia natural del extremo N del hGM-CSF, con una longitud de 14 aminoácidos que incluye tanto el epitope APARSPS como

los 4 sitios potenciales de O-glicosilación, los cuales se encuentran parcial o totalmente ocupados en la proteína nativa. La segunda etiqueta, mGMOP (APARSPSPTPTPTPT), fue diseñada *in silico* a partir del péptido GMOP con el objetivo de incrementar la probabilidad de O-glicosilación. Está compuesta por 15 aminoácidos: los 7 primeros coinciden con el extremo N del hGM-CSF y los 8 residuos adicionales incluyen 4 repeticiones de Pro y Thr, lo que permite generar un total de 6 sitios potenciales de O-glicosilación (Sales y col., 2021). Como se puede observar, la etiqueta mGMOP también incluye el epítopo APARSPS.

De esta manera, se confeccionaron 2 etiquetas peptídicas con potencial bifuncional: por un lado, para mejorar las propiedades farmacocinéticas de las proteínas de fusión debido a la presencia de la O-glicosilación, y por el otro, para actuar como epítopos para el desarrollo sistemas de purificación por afinidad y de otras metodologías analíticas basadas en la interacción epítopo-anticuerpo, aprovechando la posibilidad de modular esta unión mediante fuerza iónica. Estas características hacen de GMOP y mGMOP herramientas versátiles tanto para el diseño de bioterapéuticos de acción prolongada como para el desarrollo de estrategias de detección, cuantificación y purificación eficientes.

6.1. Diseño de proteínas de fusión con las etiquetas GMOP y mGMOP

La estrategia de glicoingeniería basada en la fusión de péptidos susceptibles de incorporar O-glicanos en los extremos N o C de una proteína fue previamente explorada en nuestro laboratorio mediante el uso del péptido CTP. Como se mencionó anteriormente, este péptido se ha utilizado principalmente para aumentar la vida media de proteínas terapéuticas, aprovechando su alta glicosilación y estabilidad. De esta manera, se diseñaron tres variantes: CTP-rhIFN, rhIFN-CTP y CTP-rhIFN-CTP, que presentaron mayor masa molecular y número de isoformas en comparación con el IFN-wt. Las variantes con una sola copia de CTP mostraron una mejora en los parámetros farmacocinéticos con respecto al IFN-wt, aunque en menor medida que la variante con dos copias, la cual exhibió la mayor prolongación de vida media y reducción del *clearance* (Ceaglio y col., 2016).

En función de estos antecedentes, se evaluaron los péptidos GMOP y mGMOP como etiquetas de fusión al hIFN- α 2b, generando dos variantes con una única copia de la etiqueta en el extremo N: GMOP-IFN y mGMOP-IFN. La incorporación de O-glicanos fue exitosa, incrementando la masa molecular y la carga negativa de las nuevas moléculas. Esta modificación no alteró la actividad biológica antiviral *in vitro* de las variantes en comparación con la molécula no modificada *wild type*. Contrariamente, se observó un importante descenso en la actividad antiproliferativa *in vitro*, lo que coincide con observaciones previas de que esta función es más sensible a cambios en la glicosilación. Esto puede explicarse con el hecho de que la inducción del estado antiviral se logra con bajas concentraciones de ligando que son suficientes para activar la vía con una fuerza de interacción menor y sin necesidad de alcanzar

la estabilidad en la unión inicial al receptor; mientras que la actividad antiproliferativa del hIFN requiere concentraciones más altas de la citoquina, así como también la conformación de un complejo ternario estable con las dos subunidades del receptor (IFNAR-1 e IFNAR-2). Cabe señalar que los bioensayos *in vitro* no contemplan diferencias farmacocinéticas, de distribución corporal ni de metabolismo entre compuestos. De hecho, ambas quimeras mostraron un perfil farmacocinético significativamente mejorado respecto del IFN-wt no modificado, con un aumento del tiempo de vida media plasmática y una reducción del *clearance* aparente. Sin embargo, aunque la variante mGMOP-IFN, que presenta dos sitios adicionales de O-glicosilación, mostró una mayor glicosilación que GMOP-IFN, no se observaron diferencias significativas entre ellas en cuanto a su comportamiento farmacocinético. Asimismo, ambas moléculas presentaron una mayor estabilidad térmica y resistencia a proteasas plasmáticas que la molécula sin modificar, propiedades atribuidas al efecto estabilizante de los O-glicanos (Sales y col., 2021).

En comparación con el péptido CTP, la etiqueta mGMOP resultó ser una estrategia más eficiente a los fines de incrementar la masa molecular aparente del hIFN- α 2b mediante O-glicosilación. La etiqueta mGMOP permite incorporar más sitios de O-glicosilación en un tamaño peptídico inferior (15 aminoácidos) que el péptido CTP, que tiene 28 residuos, pero solo 4 sitios potenciales de O-glicosilación. Esto sugiere que CTP, por su tamaño, podría alterar en mayor medida la estructura de la proteína, incrementando el riesgo de inmunogenicidad. El uso de péptidos más cortos con mayor densidad de sitios de conocida incorporación de O-glicanos como mGMOP representaría una ventaja, especialmente en la construcción de variantes con múltiples repeticiones peptídicas, donde el riesgo de pérdida de actividad o inestabilidad estructural es mayor.

Teniendo en cuenta que la incorporación de CTP en ambos extremos de la proteína resultó más efectiva para mejorar la farmacocinética que la fusión en un solo extremo, se evaluó la fusión de múltiples copias de mGMOP al hIFN- α 2b. Esta etiqueta fue seleccionada debido a su superior capacidad de glicosilación observada en los estudios anteriores. Bajo la hipótesis de que la adición de múltiples copias de mGMOP en el extremo N y/o C produciría un efecto acumulativo sobre las propiedades farmacocinéticas, se construyeron cuatro nuevas variantes de hIFN- α 2b con diferentes números y posiciones de copias de mGMOP en los extremos N y/o C (Iturraspe y col., 2019):

- mGMOP₂-IFN (2 copias)
- mGMOP₃-IFN (3 copias)
- mGMOP₂-IFN-mGMOP (3 copias)
- mGMOP₃-IFN-mGMOP (4 copias) en diferentes posiciones.

Las variantes mostraron un aumento progresivo en la masa molecular y en el número de isoformas ácidas conforme al aumento del número de etiquetas, confirmando una mayor

glicosilación. Sin embargo, también se observaron diferencias según la posición del péptido: mGMOP₂-IFN-mGMOP presentó una mayor masa molecular y glicoformas con menor pI que mGMOP₃-IFN (ambas con tres copias del péptido), lo que indicaría la presencia de un mayor contenido de glicanos. Estos resultados fueron respaldados mediante análisis *in silico* y O-deglicosilación.

Desde el punto de vista funcional, todas las quimeras mostraron una disminución de la actividad antiviral y antiproliferativa *in vitro*, en correlación con el número de etiquetas fusionadas y, consecuentemente, con el grado de glicosilación alcanzado. La actividad antiviral del hIFN comenzó a disminuir notablemente a partir de la incorporación de la tercera copia de mGMOP. En cambio, la actividad antiproliferativa mostró una mayor susceptibilidad, evidenciándose una notable reducción con la incorporación de dos copias, la cual se acentuó con cada adición sucesiva. Esto sugiere que las modificaciones estructurales afectan en mayor medida la capacidad del hIFN para inhibir el crecimiento celular que su efecto antiviral. En términos farmacocinéticos, las variantes con mayor contenido de glicanos (mGMOP₂-IFN-mGMOP y mGMOP₃-IFN-mGMOP) presentaron mejoras significativas en el tiempo de vida media y el *clearance* aparente. Este incremento no se relacionó directamente con el número de etiquetas fusionadas, sino con el contenido O-glicosídico alcanzado, ya que, si bien mGMOP₃-IFN presenta el mismo número de etiquetas que mGMOP₂-IFN-mGMOP, su menor masa molecular aparente en conjunto con su mayor proporción de isoformas de menor carácter ácido resultó en un tiempo de vida media inferior.

En conjunto, estos resultados indican que la fusión de múltiples copias del péptido mGMOP en los extremos del hIFN- α 2b constituye una estrategia de glicoingeniería prometedora para mejorar las propiedades farmacocinéticas de proteínas terapéuticas con corta vida media. En particular, en condiciones de hiper-O-glicosilación definidas por el número de copias, mGMOP podría ser más eficiente que GMOP para prolongar la vida media plasmática, al favorecer una mayor incorporación de ácido siálico y, con ello, reducir la depuración. Sin embargo, vale recordar que la adición de GMOP afectó en menor medida la actividad biológica *in vitro* del hIFN- α 2b, lo cual podría indicar una mayor afinidad por el receptor debido al menor contenido de ácido siálico. En este contexto, resulta necesario determinar si la actividad biológica *in vivo* se ve más influenciada por la mejora en las propiedades farmacocinéticas o por una mayor interacción con su receptor. Esto permitirá analizar con mayor precisión el impacto del tipo y del número de copias de la etiqueta.

Considerando lo expuesto, surgieron los siguientes interrogantes, cuyas respuestas serán de utilidad para definir una estrategia tecnológica orientada a la producción de proteínas hiper-O-glicosiladas de interés terapéutico:

1. Condiciones de hiper-O-glicosilación: ¿El incremento en el número de etiquetas fusionadas permitirá mejorar las propiedades farmacocinéticas conferidas por mGMOP a

la proteína de interés en comparación con el uso del mismo número de unidades de GMOP? En esta pregunta debe contemplarse el impacto de una mayor O-glicosilación generada por las múltiples repeticiones de mGMOP con respecto a las de GMOP sobre los mecanismos de depuración plasmática de las glicoproteínas, en particular, el efecto del incremento en el contenido de ácido siálico.

2. Actividad *in vitro*: ¿El grado de descenso de la actividad biológica *in vitro* provocado por mGMOP con respecto a GMOP se intensificará al aumentar el número de copias de cada etiqueta? Resulta clave considerar el efecto adverso de la carga negativa aportada por los residuos de ácido siálico sobre la interacción con los receptores de proteínas naturales y modificadas.

3. Actividad biológica *in vivo*: En proteínas hiper-O-glicosiladas, ¿la mejora en sus propiedades farmacocinéticas o el aumento de su capacidad de unión al receptor tendrá mayor incidencia en el desarrollo de su actividad biológica *in vivo*?

A lo largo de este trabajo de tesis, se buscará dar respuesta a estos interrogantes. Asimismo, cabe mencionar que en los trabajos previamente reportados no se avanzó en la evaluación de las etiquetas como herramientas de purificación o para otras aplicaciones analíticas. Por lo tanto, el presente trabajo también propone validar la efectividad del sistema APAR–mAb CC1H7 en cromatografía de afinidad, mediante la optimización de las condiciones de unión y elución para mejorar la eficiencia de purificación, así como explorar su utilidad en métodos de detección y cuantificación.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERAL

El objetivo general del presente trabajo de Tesis es evaluar la capacidad de dos nuevas etiquetas peptídicas, ambas derivadas del hGM-CSF, para incrementar la actividad biológica *in vivo* de proteínas recombinantes, en condiciones de hiper-O-glicosilación.

Además, se propone analizar si dichas etiquetas pueden conferir a las proteínas la posibilidad de ser detectadas, cuantificadas y purificadas mediante el empleo de un único mAb.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar el sistema de afinidad mGMOP-mAb CCH7 como herramienta para la purificación, detección y cuantificación de proteínas recombinantes.
2. Explorar la bifuncionalidad de las etiquetas GMOP y mGMOP, analizando la contribución de sus O-glicanos a la mejora de la farmacocinética y de la actividad biológica *in vivo* de proteínas recombinantes, utilizando al hIFN- α 2b como proteína modelo.
3. Validar la aplicabilidad de las etiquetas en otra proteína modelo de interés terapéutico (rhEPO), con el fin de integrar ventajas funcionales y operativas.



METODOLOGÍA

MATERIALES Y MÉTODOS

1. REACTIVOS Y SOLUCIONES

Excepto en los casos donde se aclara expresamente, todas las soluciones acuosas fueron preparadas con agua ultrapura obtenida por ósmosis inversa (resistividad 18,2 M Ω .cm) y filtración (0,22 μ m), empleando un equipo Milli Q^{UF} (Millipore). Todos los reactivos fueron de grado de pureza analítica.

2. BIOLOGÍA MOLECULAR

2.1. Línea celular procariota

- ***E. coli* TOP 10 (Invitrogen)**: cepa bacteriana empleada para el aislamiento y la amplificación de los plásmidos que contienen las construcciones de interés.

2.2. Medios de cultivo para células procariotas

Los medios de cultivo empleados para el crecimiento de bacterias fueron esterilizados por autoclave durante 15 min a 1 atm y a 120 °C. A continuación, se detalla cada uno de ellos:

- **Medio LB (*Lysogeny Broth*)**: empleado para el crecimiento bacteriano en medio líquido. Composición: triptona 10 g.L⁻¹, extracto de levadura 5 g.L⁻¹ y 10 g.L⁻¹ de NaCl. El pH se ajustó a 7,2 con NaOH 4 N.
- **Medio LB-Antibiótico**: caldo LB suplementado con ampicilina 100 μ g.mL⁻¹. Utilizado para el crecimiento de clones resistentes a dicho antibiótico.
- **Medio Agar-LB**: empleado para el crecimiento bacteriano en medio sólido. Composición: medio LB suplementado con agar 2% (p/v).
- **Medio Agar-LB-Antibiótico**: suplementado con ampicilina 100 μ g.mL⁻¹, empleado para la selección de clones bacterianos. Dado que la ampicilina es termolábil, se añadió al medio de cultivo estéril fundido una vez que la temperatura alcanzó aproximadamente 50 °C. Tras homogeneizar la mezcla, se distribuyeron 15 mL del mismo en placas de Petri estériles de 90 mm de diámetro.
- **Medio LB-MS+G**: empleado para la preparación de células competentes de *E. coli*. Composición: constituido por medio LB suplementado con MgSO₄.7H₂O 10 mM y glucosa 0,2% (p/v).

2.3. Diseño y construcción de las proteínas de fusión

2.3.1. Diseño *in silico* de variantes de hIFN- α 2b

Mediante el uso de herramientas bioinformáticas se diseñaron dos variantes de hIFN- α 2b, de ahora en adelante hIFN, fusionadas a tres copias del péptido GMOP o mGMOP en el extremo

N, y una copia adicional del mismo péptido en el extremo C de la citoquina. Estas construcciones se denominaron GMOP₃-IFN-GMOP y mGMOP₃-IFN-mGMOP, respectivamente. En ambas se introdujeron sitios de restricción para las enzimas SmaI y KpnI entre las repeticiones de los péptidos. La secuencia completa fue flanqueada por sitios reconocidos por las enzimas XbaI y Sall. Estas enzimas presentan condiciones de reacción compatibles, lo que permitió optimizar la eficiencia de digestión enzimática y reducir el tiempo requerido para este procedimiento.

Posteriormente, se evaluó el posible impacto de la adición de los péptidos en el extremo N sobre la secuencia de reconocimiento y clivaje del péptido señal (PS) del hIFN, utilizando el programa informático SignalP 4.1 Server² (Petersen y col., 2011).

Finalmente, ambas construcciones se analizaron empleando los servidores bioinformáticos NetOGlyc 4.0 Server³ (Julenius y col., 2005) e ISOGlyP⁴ (*isoform-specific O-glycosylation prediction*) (Mazuca y Mohl, 2024) con el fin de predecir la probabilidad de O-glicosilación y estimar el número de sitios susceptibles de modificación en cada variante.

Luego del análisis *in silico*, se solicitó a la empresa Gene Universal la síntesis de las secuencias de ADN quimérico correspondientes a las moléculas diseñadas. Estas secuencias fueron provistas como ADN clonado en los vectores pUC57 (AmpR) y pMA-T (AmpR).

2.3.2. Diseño *in silico* de variantes de hEPO

De manera similar a lo realizado con las variantes de hIFN, se diseñaron dos nuevas variantes de rhEPO: GMOP₃-EPO-GMOP y mGMOP₃-EPO-mGMOP, mediante la fusión de tres copias de cada etiqueta al extremo N y una copia adicional al extremo C. En ambos casos, se incorporaron sitios de restricción adicionales para las enzimas SmaI y KpnI entre las etiquetas, con el objetivo de facilitar la generación de variantes con un menor número de copias si fuera necesario. La secuencia de interés fue flanqueada por los sitios de restricción reconocidos por las enzimas BamHI y XhoI, las cuales presentan condiciones compatibles para una digestión simultánea.

Al igual que con las variantes de hIFN, se realizó el análisis mediante SignalP 4.1 Server para evaluar el efecto del agregado de los péptidos en el extremo N sobre la secuencia de clivaje del péptido señal de la proteína. Una vez realizados los análisis *in silico* para identificar los posibles sitios de O-glicosilación, se solicitó la síntesis de las secuencias de ADN quimérico a la empresa Gene Universal. Ambas construcciones fueron provistas como ADN clonado en vectores pUC57 con resistencia a ampicilina.

² <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>

³ <https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetOGlyc-4.0/>

⁴ <https://isoglyp.utep.edu/>

2.4. Vectores Plasmídicos

A continuación, se describen los vectores plasmídicos utilizados para la generación de las distintas líneas celulares.

2.4.1. Vectores pUC y pMA-T

Los vectores plasmídicos utilizados para la generación de las líneas celulares contienen:

- Un origen de replicación bacteriano (ORI), para la amplificación del plásmido en *E. coli*.
- Un gen de resistencia al antibiótico ampicilina (AmpR)
- Un sitio de múltiple clonado, localizado corriente abajo del promotor temprano de citomegalovirus (CMV)
- La secuencia codificante de la proteína de interés:
 - GMOP₃-IFN-GMOP de 773 pb o mGMOP₃-IFN-mGMOP de 801 pb.
 - GMOP₃-rhEPO-GMOP de 770 pb o mGMOP₃-rhEPO-mGMOP de 782 pb.

En las cuatro variantes, las primeras 51 pb corresponden al péptido señal del GM-CSF.

2.4.2. Vectores pLV-pLK

Las secuencias provenientes de los plásmidos pUC57 y pMA-T fueron subclonadas en vectores lentivirales pLV-pLK, diseñados para la producción de partículas lentivirales. Este vector lentiviral posee 7700 pb y presenta las siguientes características:

- Un origen de replicación bacteriano (ORI) para la amplificación del plásmido en *E. coli*.
- Un gen que otorga resistencia al antibiótico ampicilina (AmpR).
- Un sitio de múltiple clonado, corriente abajo del promotor CMV.
- Un gen que codifica para la enzima puromicina N-acetiltransferasa para la selección de células eucariotas con el antibiótico puromicina.
- La presencia de una región RRE (*Rev Response Element*), altamente estructurada, que actúa como sitio de unión para la proteína Rev, la cual permite el transporte de los ARNs sin procesar o parcialmente procesados desde el núcleo al citoplasma.
- Una región PBS (*Primer Binding Site*), que actúa como cebador para la transcriptasa reversa, en el momento de iniciar la síntesis de la hebra (-) del ADN viral.
- La secuencia cPPT (*Central Polypurine Tract*), que actúa como cebador de la hebra (+) en la síntesis del ADN viral.
- Elemento regulatorio postranscripcional del virus de la hepatitis de *Woodchuck* (WPRE).
- Una señal de empaquetamiento ψ (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 partículas lentivirales (PLs) se encuentran flanqueadas por las repeticiones terminales largas (5' LTR y 3' LTR).

3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.1. Reactivos para técnicas de biología molecular

- **Solución de conservación:** utilizada para la preservación de clones bacterianos competentes. Composición: medio LB con glicerol 36% (p/v), PEG (MW7500) 12% (p/v), MgSO₄·7H₂O 12 mM. Esterilizada por filtración con membrana de 0,22 µm.
- **Solución *miniprep I* y *maxiprep I*:** empleadas para la revitalización de bacterias transformadas. Composición: glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM, pH 8.
- **Solución *miniprep II* y *maxiprep II*:** utilizadas para lisar la membrana bacteriana y liberar el ADN, desestabilizando su estructura. Composición: NaOH 0,2 M, SDS 0,1% (p/v).
- **Solución *miniprep III*:** solución de neutralización de pH y de precipitación. Composición: acetato de potasio 5 M (pH 5,2).
- **Solución *maxiprep III*:** solución de neutralización de pH y de precipitación. Composición: CaCl₂ 1,65 M; KAc 3,75 M (pH 5,2).
- **Solución TAE:** empleada como *buffer* de corrida en electroforesis en gel de agarosa, para mantener el pH y permitir la conducción de corriente eléctrica durante la separación de ácidos nucleicos. Composición: Tris-Acetato 40 mM pH 8, Na₂EDTA 1 mM.
- **Solución de siembra:** utilizada para sembrar las muestras en geles de agarosa. Composición: Glicerol 30% (v/v), azul de bromofenol 0,25% (p/v).

3.2. Preparación de células competentes por método químico

Para la preparación de células competentes se siguió el siguiente protocolo:

- 1) Se inoculó una placa conteniendo agar-LB mediante estría de *E. coli* TOP10, obtenidas de un stock celular conservado a -70 °C. Se cultivó durante 16-20 h a 37 °C.
- 2) Se escogió al azar una de las colonias desarrolladas y se inoculó en 10 mL de caldo LB (cultivo iniciador), realizándose una nueva incubación a 37 °C durante 18 h con agitación a 180 rpm.
- 3) Se realizó un repique tomando 500 µL del cultivo iniciador a 50 mL de medio LB-MS+G. Se dejó crecer durante 150 min a 37 °C, con agitación a 180 rpm, hasta una DO_{600 nm} de 0,5-0,6 y asegurando que no supere el valor de 0,7.
- 4) Cuando se alcanzó la densidad adecuada, se incubó en baño de hielo durante 20 min.
- 5) Posteriormente, las bacterias se cosecharon mediante centrifugación a 4 °C y 2500 x g durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 500 µL de medio LB-MS+G frío.
- 6) A esta suspensión se le adicionaron 2,5 mL de solución de conservación y se mezcló completamente mediante agitación suave.

7) Finalmente, la suspensión celular fue dispensada en alícuotas de 50 μL en criotubos enfriados previamente, los cuales fueron conservados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 presentes en el medio de cultivo 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^{2+} necesarios para las reacciones enzimáticas que permiten la replicación del ADN y aumenta la eficiencia de transformación.

Para asegurar la continuidad de la esterilidad del cultivo y estimar la eficiencia de transformación, se realizó un control de las células competentes preparadas. Para ello, una vez conservadas las bacterias competentes durante al menos 16 h a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, se descongelaron 2 criotubos: uno de ellos se transformó con 15 ng de un vector con resistencia a 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 de manera homogénea en placas de cultivo conteniendo agar-LB-ampicilina. Las células competentes fueron utilizadas solo cuando la placa del control negativo no mostró desarrollo de colonias, y cuando se obtuvieron eficiencias de transformación adecuadas en el control positivo.

3.3. Transformación de células competentes

Para realizar la transformación bacteriana, se siguieron los siguientes pasos:

- 1) Se descongelaron 100 μL de células competentes *E. coli* TOP10 y se mezclaron con 100 ng del ADN (plásmido comercial o mezcla de ligación), incubando 30 min en baño de hielo.
- 2) Se colocó el tubo en un baño a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 min e inmediatamente se transfirió nuevamente a hielo, incubándose durante otros 2 min.
- 3) Se adicionaron 700 μL de medio LB y se incubó durante 60 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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.
- 4) Las células se cosecharon mediante centrifugación a $2500 \times g$ durante 5 min a temperatura ambiente (TA), se descartaron 600 μL de sobrenadante y el sedimento se resuspendió en el volumen remanente de medio.
- 5) Finalmente, la totalidad de la suspensión celular se distribuyó en forma homogénea sobre una placa conteniendo agar-LB suplementado con ampicilina, de manera de seleccionar las bacterias transformadas, y se incubó durante 16 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Además de la placa conteniendo las bacterias transformadas con la mezcla de ligación de interés (placa "V+I"), se sembraron tres placas adicionales para realizar los controles negativo, positivo y de vector religado (placa "VR") correspondientes.

3.4. Criopreservación de cepas 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, homogeneizando para asegurar su distribución. Finalmente, fueron conservadas a -70 °C en criotubos (Sambrook y col., 1989).

3.5. Revitalización de cepas bacterianas

Para recuperar las bacterias criopreservadas, se tomó una alícuota del cultivo congelado y se inoculó en medio LB, para bacterias no transformadas, o en medio LB suplementado con antibiótico, para bacterias recombinantes. El criotubo fue conservado nuevamente a -70 °C y el cultivo inoculado fue incubado a 37 °C durante 16 h (Sambrook y col., 1989).

3.6. Preparación de ADN plasmídico

Los plásmidos fueron obtenidos a partir de cultivos de bacterias transformadas en medio LB-antibiótico. Todos los métodos de purificación y obtención del ADN se basaron en el tamaño relativamente pequeño de los plásmidos y en su naturaleza circular cerrada covalentemente.

3.6.1. Minipreparación de ADN plasmídico

Las preparaciones de plásmidos a partir de células *E. coli* TOP 10 transformadas se realizaron según el protocolo Birnboim & Doly (1979). Para ello, se prosiguió de la siguiente manera:

- 1) A partir de colonias individuales de cultivos en medio agar-LB-antibiótico se inocularon frascos conteniendo 10 mL de medio LB-antibiótico y se cultivaron durante 16-20 h con agitación a 180 rpm y 37 °C.
- 2) Se centrifugaron 1,5 mL de un cultivo saturado de células cultivadas en medio LB a 5000 $\times g$ durante 10 min.
- 3) Se descartó el sobrenadante y el sedimento celular fue resuspendido en 100 µL de solución de *miniprep* I, incubando 5 min a TA.
- 4) Se agregaron 200 µL de solución de *miniprep* II, mezclando las soluciones mediante inversión suave del tubo e incubando en hielo durante 5 min.

- 5) Se adicionaron 150 μ L de solución de *miniprep* III, mezclando por inversión suavemente, y incubándose en hielo durante 10 min.
- 6) Se centrifugó a 12000 $\times g$ durante 5 min a 4 °C y el sobrenadante se trató con 500 μ L de una mezcla de fenol saturado en Tris-HCl (pH 8) y cloroformo (1:1) con la finalidad de remover las proteínas de la muestra.
- 7) Se centrifugó durante 5 min a 12000 $\times g$ a 4 °C y el ADN de la fase acuosa se trasvasó a un tubo Eppendorf nuevo para precipitar nuevamente con 0,6 vol. de isopropanol. Se mezcló por inversión y se incubó durante 10 min a -70 °C.
- 8) El ADN plasmídico se recuperó mediante centrifugación a 12000 $\times g$ durante 5 min a 4 °C, removiendo el sobrenadante. Se lavó 2 veces con etanol 70% (v/v) para eliminar sales, centrifugando 5 min a 12000 $\times g$ y descartando el sobrenadante.
- 9) Se secó el precipitado en bloque seco a 37 °C.
- 10) Finalmente, el ADN se resuspendió en 30 μ L de agua Milli Q^{UF} autoclavada. La integridad de los plásmidos se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa.

3.6.2. Maxipreparación de ADN plasmídico

Con la finalidad de obtener cantidades suficientes de los vectores de expresión y de los vectores empaquetadores, se llevaron adelante preparaciones de ADN plasmídico en gran escala, tal como se describe a continuación:

- 1) Se inocularon 10 mL de medio de cultivo LB-antibiótico con una colonia proveniente del medio agar-LB-antibiótico y se incubó a 37 °C con agitación a 180 rpm durante 16 h.
- 2) A este precultivo se le adicionaron 90 mL de LB-antibiótico y se lo cultivó durante otras 8 h en las mismas condiciones.
- 3) Posteriormente, el cultivo se amplificó en un erlenmeyer conteniendo 200 mL de LB-antibiótico y se incubó durante 16-20 h adicionales en las mismas condiciones.
- 4) El cultivo se centrifugó a 2500 $\times g$ durante 10 min a 4 °C, descartándose el sobrenadante.
- 5) Se resuspendió el sedimento celular en 10 mL de solución I de *maxiprep* y se colocó en hielo 5 min.
- 6) Se agregaron 20 mL de solución II de *maxiprep* y se homogeneizó suavemente para favorecer la lisis celular, incubándose en hielo durante 5 min.
- 7) Se añadieron 20 mL de solución III de *maxiprep*, se homogeneizó nuevamente por inversión y se incubó en hielo por 10 min.
- 8) Se centrifugó la solución a 2500 $\times g$ por 30 min a 4 °C y se filtró el sobrenadante con papel de filtro en tubos cónicos de 50 mL. Se precipitó con 0,6 vol. de isopropanol durante 20 min a -70 °C.

- 9) Se centrifugó 20 min a 2500 x g a 4 °C y se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 1 mL de agua Milli Q^{UF} autoclavada y se dividió en dos tubos Eppendorf, en los cuales se realizaron extracciones con fenol saturado en Tris-HCl (pH 8) y cloroformo (1:1) a fin de remover las proteínas de la muestra.
- 10) Luego, se centrifugó durante 5 min a 8000 x g a TA y el ADN de la fase acuosa se precipitó durante 20 min a -70 °C con 0,6 vol. de isopropanol.
- 11) Se centrifugó a 12000 x g por 20 min a 4 °C y el precipitado fue lavado con 300 µL de 70% (v/v) etanol.
- 12) Tras otra centrifugación a 12000 x g por 5 min a 4 °C, el sedimento obtenido fue secado en un bloque seco termostatzado a 37 °C, hasta eliminar completamente el agua de la muestra.
- 13) El precipitado fue resuspendido en 500 µL de agua Milli Q^{UF} autoclavada, suplementada con 100 µg.mL⁻¹ de RNAsa A, e incubado durante 1 h a 37 °C en bloque seco, para eliminar restos de ARN.
- 14) Se realizó una nueva extracción con fenol saturado en Tris-HCl (pH 8) y cloroformo (1:1). a fase acuosa se precipitó durante 20 min a -70 °C con 0,6 vol. de isopropanol en presencia de acetato de sodio (NaOAc) 0,3 M - pH 5,2. Se centrifugó a 12000 x g por 20 min a 4 °C.
- 15) El precipitado fue lavado nuevamente con 300 µL de etanol 70% (v/v), centrifugado a 12000 x g por 5 min a 4 °C y secado en bloque seco a 37 °C.
- 16) Finalmente, el ADN fue resuspendido en 300 µL de agua Milli Q^{UF} autoclavada y se determinó la concentración y pureza del ADN plasmídico obtenido.

3.7. Determinación de la concentración y la pureza del ADN

La absorbancia de las muestras se determinó a $\lambda = 260$ nm y $\lambda = 280$ nm en espectrofotómetro UV-visible (Ultrospec 2000 GE Healthcare), calculándose la concentración y pureza de los plásmidos según las siguientes ecuaciones:

$$\text{Concentración de ADN } (\mu\text{g. mL}^{-1}) = DO (260 \text{ nm}) \times 50 \frac{(\mu\text{g. mL}^{-1} \text{ ADN})}{DO} \times \frac{1}{\text{Dilución}} \quad (1)$$

$$\text{Pureza de la muestra} = \frac{DO (260 \text{ nm})}{DO (280 \text{ nm})} \quad (2)$$

El valor de pureza debe estar comprendido en el rango entre 1,8 y 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.

3.8. 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 la digestión, los fragmentos se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa para su posterior análisis y/o purificación.

3.9. Electroforesis en gel de agarosa

Las separaciones de ADN en geles de agarosa se realizaron empleando el sistema submarino (Green & Sambrook, 2019). Para la preparación y corrida de los geles, de concentración de agarosa 1% (p/v), se siguieron los siguientes pasos:

- 1) Se pesó 1 g de agarosa y se disolvió en solución reguladora TAE en horno microondas hasta su completa solubilización.
- 2) La solución se enfrió a 60 °C y se adicionó 10 μL del colorante *SYBR® Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen). Este colorante es un agente intercalante que se inserta en la estructura secundaria de la doble hélice del ADN, acoplándose energéticamente a los ácidos nucleicos que lo forman, lo que produce un notable incremento de su tasa de emisión fluorescente. Este fenómeno se conoce como transferencia de energía mediante resonancia de fluorescencia. El complejo resultante ADN-SYBR presenta un pico de absorción a $\lambda=498$ nm y un pico de emisión a $\lambda=522$ nm (correspondiente a la zona verde del espectro).
- 3) Esta solución se colocó en un soporte adecuado y se le introdujo un peine de 1 mm de espesor para formar los carriles de siembra, el cual se retiró una vez solidificado.
- 4) El gel se colocó en una cuba electroforética y se cubrió completamente con solución TAE.
- 5) Las muestras de ADN se mezclaron con solución de siembra 10X y cuidadosamente se sembraron en cada una de las calles del gel. Para estimar la longitud de los fragmentos de ADN separados se sembró el marcador de masa molecular *Trans 2K plus II Molecular Weight Marker* (TransGen Biotech).
- 6) Se aplicó un voltaje entre 80-100 V hasta observar una adecuada migración del colorante presente en la solución de siembra.
- 7) Finalmente, los geles fueron examinados con un transiluminador *Safe Imager™* (Invitrogen) y fotografiados.

3.10. Precipitación del ADN

Los fragmentos de ADN obtenidos luego de la digestión con enzimas de restricción fueron aislados y concentrados, en determinados casos, mediante precipitación con isopropanol. Esto se efectuó con el fin de eliminar los fragmentos cortos de ADN liberados, las sales y las enzimas de restricción. Para esto:

- 1) La muestra se llevó a un volumen final de 200 μL con agua autoclavada, adicionando 20 μL de NaOAc 3 M.
- 2) Se agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol y se incubaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 min.
- 3) Se centrifugaron a 12000 $\times g$ durante 20 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El precipitado fue lavado con 300 μL de etanol frío 70% (v/v).
- 4) Las muestras se centrifugaron nuevamente a 12000 $\times g$ durante 5 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y el precipitado obtenido se secó en bloque seco termostatzado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta eliminar completamente el agua de la muestra.
- 5) El ADN se resuspendió en 50 μL de agua Milli Q^{UF} autoclavada.

3.11. Purificación del ADN a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de ADN separados por electroforesis en geles de agarosa fueron purificados utilizando el kit comercial *QIAquick Gel Extration Kit* (QIAGEN), siguiendo las recomendaciones del fabricante, como se describe a continuación:

- 1) La fracción de gel conteniendo la banda de interés se separó con bisturí y se colocó dentro de un tubo Eppendorf.
- 2) Se agregaron 3 volúmenes de solución QG por cada volumen de gel (100 mg de gel equivalen aproximadamente a 100 μL).
- 3) Se incubó 10 min en baño de agua a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, mezclando por inversión cada 2-3 min.
- 4) La muestra se transfirió a una columna de purificación (*QIAquick spin column*) dentro de su respectivo tubo colector y se centrifugó durante 1 min a 13000 $\times g$.
- 5) Se descartó el sobrenadante y se agregaron 500 μL de solución QG a la columna, centrifugando en idénticas condiciones.
- 6) Se lavó con 750 μL de solución PE, centrifugando 1 min a 13000 $\times g$.
- 7) Se descartó el sobrenadante y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones para descartar toda la solución PE residual.
- 8) Se transfirió la columna a otro tubo Eppendorf y el ADN se eluyó con 50 μL de agua Milli Q^{UF} autoclavada.
- 9) La purificación se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa.
- 10) Se determinó la pureza y la concentración de los fragmentos mediante lectura espectrofotométrica (sección 3.7).

3.12. Reacción de ligación de ADN

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo en un volumen de 20 μ L, utilizando la enzima T4 ADN ligasa, siguiendo el protocolo indicado por el proveedor. Para el vector pLV-pLK se utilizó una relación 5:1 de inserto/plásmido. La mezcla de reacción se incubó durante toda la noche a 4 °C. El control de plásmido religado se llevó a cabo reemplazando el volumen correspondiente al inserto por agua autoclavada.

Luego de la reacción de ligación, se utilizó la mezcla de reacción obtenida para transformar células *E. coli* TOP10 competentes.

3.13. Secuenciación del ADN plasmídico

La identidad y ausencia de mutaciones en las construcciones obtenidas fueron verificadas mediante secuenciación automática del ADN plasmídico. Para ello, se emplearon los oligonucleótidos LV-rev (5'-ATAGCATGATACAAAGGCAT-3') y CMV-F (5'-CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3').

4. CULTIVOS DE CÉLULAS DE MAMÍFERO

4.1. Líneas celulares

A continuación, se detallan las líneas celulares de mamífero empleadas durante el desarrollo del presente trabajo, así como su procedencia, características y utilidad:

- **HEK293T/17 (*Human Embryonic Kidney*):** Se trata de un clon derivado de la línea celular HEK293 establecida a partir de riñón de embrión humano obtenido por Graham y col. (1977) que fue modificada para expresar constitutivamente el antígeno T del SV40. En particular, el clon 17 fue seleccionado específicamente por su alta transfectabilidad. Se obtuvo de *American Type Culture Collection*® (ATCC), EE.UU, (ATCC® CRL-11268™) y se utilizó para el ensamblado de PLs necesarias para el proceso de transducción. Para su cultivo, se utilizó el medio DMEM para HEK suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10% (v/v) y glutamina 2 mM.
- **sCHO-K1 (*Chinese Hamster Ovary*):** Es un clon de la línea celular CHO, derivada de ovario de hámster chino adulto (Puck y col., 1958), adquirido a ATCC (ATCC® CCL_61™), y que fue adaptado a crecer en suspensión en el laboratorio, aunque también conserva la capacidad de crecer en condiciones de adherencia. Fue empleado como huésped para la expresión de las proteínas recombinantes. En el resto del manuscrito, esta línea celular será denominada como sCHO. Para su cultivo en adherencia, se utilizó el medio DMEM/F12 suplementado con SFB 5% (v/v) y glutamina 2 mM. Para su cultivo en suspensión, se emplearon los medios EX-CELL® 302 suplementado con glutamina 4 mM y CD BHK-21 PM suplementado con glutamina 2 mM.

- **Hibridoma CC1H7:** Es un clon productor del mAb CC1H7, obtenido y caracterizado en el Laboratorio de Cultivos Celulares mediante fusión de células de mieloma murino NS0 PA 2973 adquiridas en ATCC (ATCC® - PA 2973) y esplenocitos de ratones de la cepa Balb/c inmunizados con rhGM-CSF (Oggero y col., 2004). Este anticuerpo presenta un isotipo IgG1 y reconoce el epítipo APARSPS presente en hGM-SCF y en los péptidos GMOP y mGMOP. Este clon se cultivó en adherencia en medio DMEM suplementado con piruvato de sodio 0,11 g.L⁻¹ y SFB 20% (v/v). Posteriormente, fue adaptado a crecer en suspensión y agitación en medio constituido por 50% de EXCELL® 620 y 50% de DMEM/F12.
- **MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney*):** Es una línea celular derivada de riñón de un bovino adulto sano (Madin y Darby, 1958), provista por la Asociación Banco Argentina de Células (ABAC, Buenos Aires, Argentina), que corresponde a la línea ATCC® CCL-22™. Se utilizó en ensayos de valoración biológica antiviral *in vitro* del hIFN, ya que es susceptible a la infección con el virus de la estomatitis vesicular (VSV). Estas células se cultivaron en medio MEM suplementado con SFB 10% (v/v) y glutamina 2 mM. Para los ensayos de bioactividad se empleó MEM con SFB 2% (v/v).
- **Daudi:** Es una línea celular humana derivada de linfoma de *Burkitt* (Klein y col., 1968; Nadkarni y col., 1969). Fue adquirida de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares, DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*, Braunschweig, Alemania) y corresponde a la línea ATCC® CCL-213™. Se empleó para la valoración de la actividad biológica antiproliferativa *in vitro* del hIFN. Estas células se crecieron en medio RPMI 1640 suplementado con SFB 10% (v/v) y glutamina 2 mM.
- **UT-7:** Se trata de una línea establecida a partir de células de médula ósea de un paciente con leucemia mieloide (Komatsu y col., 1993). Son células constitutivamente dependientes de citoquinas tales como GM-CSF, IL-3 y hEPO. Fueron obtenidas del banco DSMZ y originalmente se cultivaron en medio IMDM basal suplementado con SFB 20% (v/v), rhGM-CSF 5 ng.mL⁻¹ y glutamina 2 mM. En nuestro laboratorio, esta línea fue adaptada durante 5 meses a crecer sólo en presencia de rhEPO 16,8 ng.mL⁻¹. Por esa razón, se denominó **UT-7/EPO**. Se empleó para la valoración de la actividad hematopoyética *in vitro* de rhEPO, en un medio de ensayo idéntico al medio de crecimiento, pero carente de citoquinas.
- **TF-1:** Constituye una línea celular derivada de eritoblastos obtenidos de la médula ósea de un hombre asiático de 35 años con una severa pancitopenia, establecida por Kitamura y col. (1989). Fue adquirida de ATCC (ATCC® CRL-2003™). Estas células son dependientes de GM-CSF e IL-3 para su crecimiento a largo plazo y se emplearon para la valoración de la actividad hematopoyética *in vitro* de rhEPO. Para su cultivo, se empleó el

medio RPMI 1640 suplementado con SFB 10% (v/v), rhGM-CSF 2 ng.mL⁻¹ y glutamina 2 mM. Para los ensayos, se cultivaron en el mismo medio en ausencia de rhGM-CSF.

- **PC-3:** Es una línea celular humana establecida a partir una metástasis de adenocarcinoma prostático en un paciente adulto (Kaighn y col., 1979). Corresponde a la línea ATCC® CRL-1435™ y fue obtenida de la colección de cultivos del DSMZ. Se caracteriza por su capacidad de formar tumores en ratones *nude*, lo que permitió su utilización en la generación de un modelo de carcinoma subcutáneo para evaluar la actividad antitumoral *in vivo* de hIFN.

4.2. Cepa viral

- **Virus de la estomatitis vesicular (VSV):** cepa Indiana, cedida gentilmente por el Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas “Dr. Julio I. Maiztegui” (ATCC VR-158). Se utilizó para los ensayos de valoración biológica antiviral *in vitro* del IFN-wt y de las variantes hiperglicosiladas.

4.3. Medios de cultivo para células eucariotas

Todos los medios de cultivos utilizados para células animales fueron preparados utilizando agua Milli Q^{UF} y ajustados a pH 7,2. Una vez preparados, fueron esterilizados por filtración, utilizando dispositivos tipo *Steritop* con membranas de 0,22 µm de tamaño de poro, y conservados a 4 °C al resguardo de la luz. Para controlar la esterilidad, cada medio se mantuvo en cuarentena durante 48 h a 37 °C mientras se llevaron a cabo los controles microbiológicos. A continuación, se detallan los medios y suplementos de cultivo empleados:

- **Medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen*):** Al medio (13,37 g.L⁻¹) se le agregó NaHCO₃ 1,6 g.L⁻¹, piruvato de sodio 0,11 g.L⁻¹ y sulfato de gentamicina 0,05 mg.mL⁻¹.

- **Medio DMEM/F12 (*DMEM/Nutrient Mixture F-12, Gibco*):** Formulado con la mezcla de los medios DMEM y Ham's F-12 en una relación 1:1 (v/v), suplementado con NaHCO₃ 2,44 g.L⁻¹ y sulfato de gentamicina 0,05 mg.mL⁻¹. Para llevar a cabo el proceso de selección de células sCHO transducidas, se adicionaron distintas concentraciones del antibiótico puromicina.

- **Medio PM (*CD BHK-21 Production Medium, Gibco*):** Es un medio químicamente definido, libre de suero y de proteínas animales, diseñado para el crecimiento de células BHK-21. Se ha empleado en el laboratorio para el crecimiento de otras líneas celulares. Se formuló con medio PM 17,70 g.L⁻¹ con el agregado de NaHCO₃ 2,32 g.L⁻¹ y gentamicina 2,32 g.L⁻¹.

- **EX-CELL® 302 Serum Free Medium (SAFC):** Medio empleado como etapa intermedia durante la adaptación de las líneas sCHO recombinantes desde su crecimiento en adherencia hasta condiciones de suspensión y agitación. Se preparó con 21,21 g.L⁻¹ de medio acondicionado con NaHCO₃ 1,6 g.L⁻¹ y sulfato de gentamicina 0,05 mg.mL⁻¹.
- **EX-CELL® 620 Serum-Free Medium for Hybridoma Cells (Merck):** Se suplementó el medio (17,16 g.L⁻¹) con NaHCO₃ 1,6 g.L⁻¹ y sulfato de gentamicina 0,05 mg.mL⁻¹.
- **Medio MEM (Minimum Essential Medium, Gibco):** Contiene medio 9,61 g.L⁻¹ más NaHCO₃ 2,2 g.L⁻¹ y sulfato de gentamicina 0,05 mg.mL⁻¹.
- **Medio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, Gibco):** Preparado con medio RPMI 10,4 g.L⁻¹, NaHCO₃ 2 g.L⁻¹ y sulfato de gentamicina 0,05 mg.mL⁻¹.
- **Medio IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Gibco):** Formulado con IMDM 17,67 g.L⁻¹, NaHCO₃ 3,024 g.L⁻¹ y sulfato de gentamicina 0,05 mg.mL⁻¹.

4.4. Soluciones y Suplementos

A continuación, se mencionan, las soluciones y suplementos utilizados en los medios de cultivo o en las técnicas de cultivo celular:

- **PBS (phosphate buffered saline):**

- KH₂PO₄ 0,60 g.L⁻¹
- Na₂HPO₄ 0,78 g.L⁻¹
- NaCl 8,80 g.L⁻¹
- pH 7,4

- **Glutamina 200 mM:**

- Glutamina 29,30 g.L⁻¹
- Medio MEM

- **Suero fetal bovino:** Para suplementar los medios de cultivo utilizados en cultivos que crecen en adherencia o que necesitan de los factores aportados por el suero. Se adicionó a cada medio basal la concentración de SFB deseada. Se empleó SFB de calidad certificada (PAA Laboratories), el cual fue descomplementado por incubación en baño de agua termostático a 56 °C durante 30 min previo a su uso.

- **Tripsina-EDTA:** Para desprender los cultivos adheridos al soporte. Se respetó una relación de 20 µl de solución de tripsina-EDTA por cada cm² de superficie:

- Tripsina 0,05% (p/v)
- Na₂EDTA 0,02% (p/v)
- Buffer PBS

5. TÉCNICAS DE CULTIVOS CELULARES

5.1. Sistemas de cultivo de células eucariotas

Todas las líneas celulares eucariotas, tanto en adherencia como en suspensión, se cultivaron en condiciones estándar de cultivo para células animales: estufa gaseada (Nuairé) a 37 °C, atmósfera de CO₂ al 5% saturada de humedad.

5.1.1. Cultivos en adherencia

Se emplearon los siguientes sistemas de cultivo:

- Placas multipozos de poliestireno de 96, 24, 12 y 6 pozos, con una superficie de 0,32; 2,00; 3,90 y 9,60 cm² por pozo, respectivamente.
- Placas de cultivo celular de 20 cm² de superficie.
- Frascos T de 25, 75 y 175 cm² de superficie.

En todos los casos, se mantuvo una relación constante de 0,4 mL de medio de cultivo por cada cm² de superficie.

5.1.2. Cultivos en suspensión

Las líneas adaptadas a crecer en suspensión se mantuvieron en una incubadora orbital (Certomat CTplus, Sartorius) con control de humedad y atmósfera, agitados a 140 rpm. Se emplearon los siguientes sistemas de cultivo:

- Frascos Schott de 100, 250, 500 y 1000 mL

5.2. Subcultivos en adherencia

Las líneas celulares que crecen adhiriéndose a una superficie sólida (sustrato) forman una monocapa. Para realizar subcultivos, se las debe liberar de este sustrato por medios mecánicos o enzimáticos. Para tal fin, cuando los cultivos alcanzaron la confluencia, se procedió a retirar el sobrenadante y lavar la monocapa con una solución de tripsina-EDTA durante 15 s a TA, con el fin de neutralizar la acción de factores antitripsina presentes en el SFB. Luego de eliminar la solución de lavado, se agregó nuevamente la misma proporción de solución de tripsina-EDTA, dejándola actuar a 37 °C el tiempo necesario para lograr el desprendimiento completo de las células adheridas. Posteriormente, se adicionó el medio de cultivo suplementado con SFB para neutralizar la acción de la tripsina y se homogeneizó la suspensión celular resultante. A partir de este tratamiento, fue posible realizar diluciones adecuadas para el mantenimiento y/o la manipulación de los cultivos.

En el caso de los hibridomas, cuando se cultivan en presencia de SFB se adhieren débilmente a la superficie del soporte, pudiendo ser fácilmente desprendidos por pipeteo, sin necesidad de métodos enzimáticos como el tratamiento con tripsina. Por esta razón, los subcultivos se

efectuaron por simple dilución, previo homogeneizado manual de la suspensión celular para asegurar la recuperación de todas las células.

5.3. Subcultivos en suspensión

Para realizar los subcultivos de las líneas celulares en suspensión, se realizaron diluciones en medio fresco, ajustando el volumen según la densidad celular obtenida por recuento. Para ello, el volumen correspondiente se centrifugó durante 8 min a $200 \times g$, se descartó el sobrenadante y las células sedimentadas se resuspendieron en el volumen adecuado de medio fresco.

Durante los procesos de adaptación al crecimiento en suspensión, las células tienden a formar agregados indeseables que pueden comprometer la viabilidad del cultivo debido a la limitación de transferencia de nutrientes y el reducido intercambio gaseoso en el interior de los cúmulos. Este inconveniente se resolvió mediante disociación mecánica por pipeteo y recambio completo del medio de cultivo (Caron y col., 2018).

5.4. Determinación de la concentración y la viabilidad celular

La determinación de la concentración y viabilidad celular se realizó mediante recuento en cámara de Neubauer (Boeco), utilizando el método de exclusión con azul tripán (Gibco) para estimar la proporción de células muertas. Esta técnica permite distinguir entre células viables y no viables dado que el colorante penetra únicamente en aquellas que presentan alteraciones en la integridad de la membrana plasmática. Las células viables no presentan coloración dado que el azul de tripán no puede ingresar a su interior, mientras que las células muertas presentan un tinte azul al microscopio de campo brillante (Cook y Mitchell, 1989). La concentración de células (X), ya sean vivas o muertas, se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$X (\text{cél. mL}^{-1}) = \frac{N (\text{cél.})}{4} \times D^{-1} \times (1 \times 10^4) (\text{mL}^{-1}) \quad (3)$$

Donde N es el número de células contadas y D es la dilución de la suspensión celular.

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

$$\text{Viabilidad (\%)} = \frac{X_v}{X_T} \times 100 \quad (4)$$

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).

5.5. Criopreservación de las líneas celulares de mamífero

Durante su cultivo, las líneas celulares se encuentran expuestas a diversas amenazas, como la contaminación con microorganismos, la diferenciación de clones no secretores y la senescencia y extinción de la línea celular. Estos fenómenos se manifiestan con mayor frecuencia durante procesos que resultan estresantes para las células, como la adaptación del cultivo al crecimiento en agitación y la reducción de la proporción de SFB en el medio de crecimiento (Gustafsson, 1990). Por ello, cuando se ha obtenido una línea celular con las características deseadas y libre de contaminación, es esencial su adecuada conservación.

La criopreservación en nitrógeno líquido constituye un método eficaz para la conservación a largo plazo tanto de líneas celulares como de hibridomas (Fuller y col., 1988), ya que garantiza el suministro reproducible y confiable de células que mantienen las características metabólicas y funcionales del momento en el cual fueron congeladas, minimizando el deterioro celular. Por otro lado, la obtención de una máxima recuperación de células viables al descongelar depende de minimizar la formación de cristales de hielo intracelular y de reducir el daño osmótico causado por la concentración de solutos durante el congelamiento (Freshney, 2014). La adición de un agente crioprotector, como el glicerol o el dimetilsulfóxido (DMSO), minimiza estos efectos negativos (Lovelock y Bishop, 1959).

Todas las líneas obtenidas se amplificaron y criopreservaron mediante la realización de un banco celular. Para ello, se empleó una técnica de enfriamiento gradual y escalonado desde TA hasta $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, ya que a estas temperaturas se observan deterioros celulares mínimos (Greene y col., 1967). La suspensión celular fue centrifugada a $200 \times g$ durante 5 min a TA y el sedimento fue resuspendido en una mezcla criogénica adecuada Tabla 1, distribuyéndose a razón de 1 mL por criotubo, los cuales fueron colocados en un soporte comercial apropiado (*Mr. Frosty*, Nalgene) y llevados a freezer a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. Este dispositivo contiene alcohol isopropílico, que permite el descenso gradual de la temperatura a razón de $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por minuto. Finalmente, los criotubos se almacenaron a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ en termos de N_2 líquido.

Tabla 1: Condiciones para la criopreservación de líneas celulares

	Densidad celular (cél.mL ⁻¹)	Mezcla criogénica
Cultivos en adherencia	$1-2 \times 10^6$	Relación 90:10 (v/v) SFB:DMSO (Sigma)
Cultivos en suspensión	1×10^7	Relación 45:45:10 (v/v) Medio fresco de crecimiento: Medio condicionado*: DMSO

*Medio de cultivo que contiene metabolitos y factores de crecimiento autócrinos producidos por las propias células durante el cultivo, lo que favorece la revitalización de las células criopreservadas.

5.6. Revitalización de las líneas celulares de mamífero

Para la revitalización de las líneas celulares criopreservadas, se llevó a cabo un descongelamiento rápido, el cual es esencial para la óptima recuperación de las células y su posterior incubación en medio de cultivo adecuado. Para ello, los criotubos se retiraron del termo de N₂ líquido y se sumergieron rápidamente en un baño de agua a 37 °C. Una vez descongelada, la suspensión celular se transfirió a un tubo cónico con 40 mL de medio de cultivo basal y se centrifugó a 200 x *g* durante 5 minutos a TA. Esto se realizó con el objetivo de diluir y eliminar rápidamente el DMSO, ya que se trata de un reactivo tóxico para las células. Luego de descartar el sobrenadante, el sedimento celular se resuspendió en un volumen adecuado de medio de cultivo y se realizó el recuento celular para evaluar la concentración y la viabilidad.

5.7. Preparación de una capa de células alimentadoras (*feeder layer*)

Para adaptar el hibridoma CC1H7 al crecimiento en medio libre de suero y en suspensión, fue necesario revitalizar un criovial previamente cultivado en presencia de SFB, mediante la preparación de una capa de células alimentadoras. Esta estrategia se adoptó debido a que los nutrientes y factores de crecimiento aportados por el medio de cultivo suplementado con SFB 20% (v/v) no resultan suficientes para que los hibridomas, al ser descongelados a baja densidad, inicien su proliferación. Una capa de células alimentadoras consiste en un cultivo de células adherentes (fibroblastos) o no adherentes (linfocitos, monocitos y granulocitos), viables y metabólicamente activas, que aportan factores de crecimiento esenciales para la proliferación de células con requerimientos metabólicos más exigentes o que se encuentran en una baja concentración celular inicial (Greenfield, 2019; Llamas y col., 2015). Para su preparación, se anestesió un ratón BALB/c con una mezcla de ketamina y xilacina (80 mg.kg⁻¹:10 mg.kg⁻¹, vía intramuscular) y se sacrificó por dislocación cervical. En condiciones estériles se extrajo el bazo, se lavó con medio DMEM y se disgregó mecánicamente. La suspensión se filtró utilizando un tamiz de malla fina de acero número 50, se centrifugó y el *pellet* celular se resuspendió en medio DMEM con piruvato suplementado con SFB 20% (v/v), sembrándose en placas de 6 pozos. Posteriormente, se descongeló el criovial del hibridoma CC1H7 sobre la capa de células alimentadoras formada, realizándose subcultivos hasta recuperar la capacidad de duplicación de los hibridomas. El cultivo se amplificó para generar el banco de trabajo del hibridoma, a partir del cual se inició la adaptación de las células al medio libre de SFB.

5.8. Desarrollo de líneas celulares recombinantes

5.8.1. Ensamblado de partículas lentivirales

5.8.1.1. Vectores lentivirales empaquetadores

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 (Baltimore, 1974; Esposito y Craigie, 1999). Gran parte de los vectores lentivirales 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 (Sakuma y col., 2012). 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. Los vectores lentivirales de tercera generación empleados en este trabajo, poseen las siguientes propiedades:

- Están pseudotipados con la glicoproteína G del VSV (VSV-G), la cual presenta 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 considerablemente mayor.
- No poseen determinadas proteínas virales accesorias (Vif, Vpu, Vpr o Nef) que son esenciales para la propagación y virulencia del HIV-1 en células primarias o *in vivo*.
- Presentan delecciones clave, las cuales generan la inactivación transcripcional de los genomas virales potencialmente empaquetables en la célula transducida.
- El promotor natural del HIV-1 es reemplazado por secuencias promotoras heterólogas.
- Para su construcción, se emplea una estrategia de cotransfección de células HEK-293T/17 con cuatro plásmidos que codifican proteínas necesarias para el ensamblado de la partícula lentiviral. 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 a 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 fueron generadas mediante cotransfección de células de la línea HEK-293T/17 con los siguientes plásmidos:

- pREV: expresado durante el empaquetamiento para inducir la exportación nuclear del vector de transferencia.
- pVSV-G: codifica la proteína G de envoltura del VSV, necesaria para la entrada de la partícula viral en la célula.

- pMDL: codifica la poliproteína gag, que incluye las proteínas de matriz y cápside necesarias para el empaquetamiento del vector de expresión, y la poliproteína pol, que da lugar a una proteasa, una transcriptasa reversa y una integrasa, requeridas para el procesamiento del genoma-vector e integración al genoma celular.
- Plásmido de transferencia pLV-PLK, que codifica la proteína de interés y confiere a las células resistencia a puromicina.

A su vez, se preparó un plásmido pLV-PLK-GFP, que expresa la proteína verde fluorescente (GFP, *Green fluorescent protein*) como control de transducción.

Los tres vectores empaquetadores del sistema lentiviral de tercera generación (Dull y col., 1998; Naldini y col., 1996) se muestran en la Figura 9.

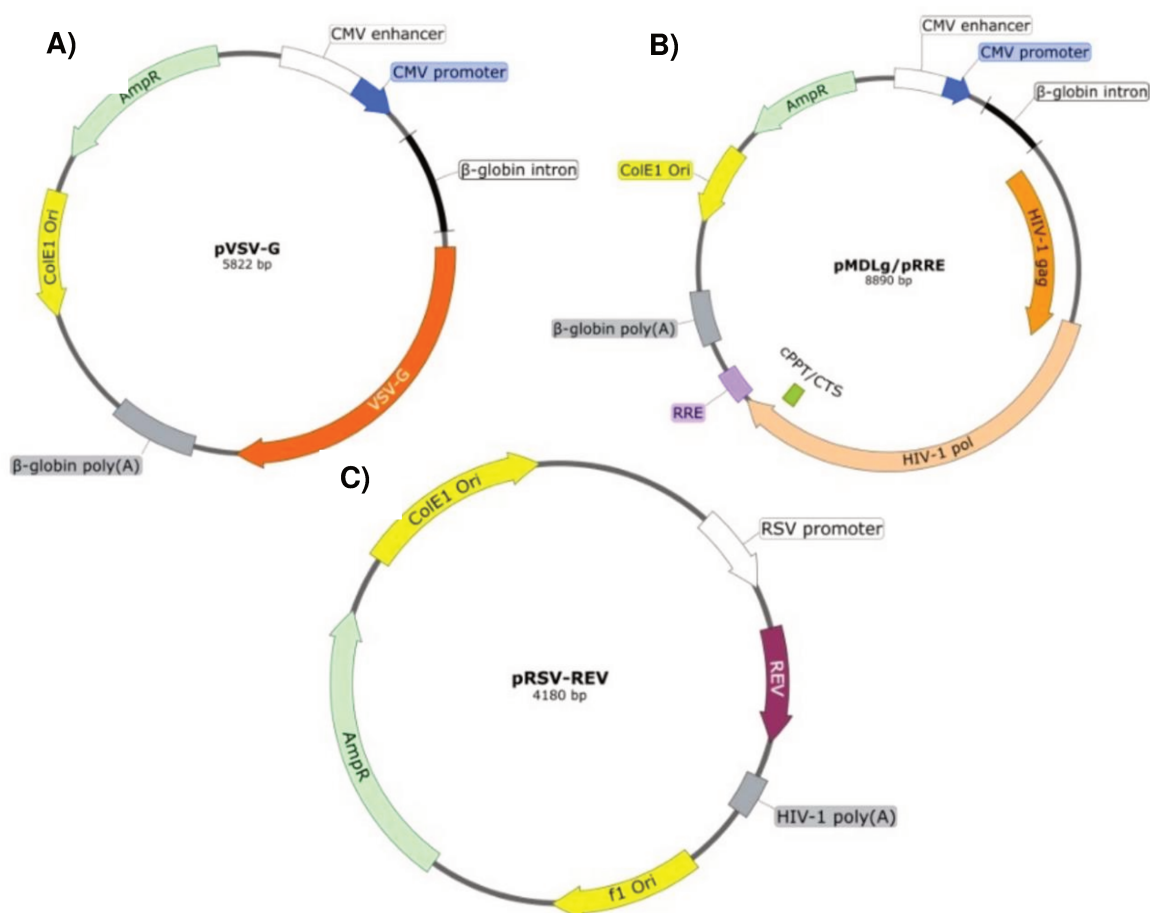


Figura 9: Representación esquemática de los vectores lentivirales empaquetadores. A) vector pVSV-G. B) vector pMDL/pRRE. C) vector pRSV-REV.

5.8.2. Metodología de ensamblado

Para el ensamblado de las PLs se llevó a cabo una cotransfección transitoria de células HEK 293T/17 empaquetadoras con cuatro plásmidos distintos:

- pMDLg/pRRE (Addgene; #12251)
- pMD.G (Addgene; #12259)
- pRSV-REV (Addgene; 12253)

- Vectores de transferencia conteniendo la secuencia de la proteína de interés: pLV-pLK GMOP₃-IFN-GMOP, pLV-pLK mGMOP₃-IFN-mGMOP, pLV-pLK GMOP₃-EPO-GMOP, pLV-pLK mGMOP₃-EPO-mGMOP, o el control de GFP (pLV-pLK-GFP).

Se utilizó como *carrier* el reactivo *Free-Style™ MAX* (FSM) (Life technologies, Gibco), una formulación libre de productos de origen animal optimizada para lograr alta eficiencia de transfección y baja citotoxicidad. Luego de 48 h posttransfección, se cosecharon los PLs a partir del sobrenadante de cultivo, se concentraron mediante ultracentrifugación y se almacenaron a -70 °C fraccionados en diferentes tubos (Fig. 10).

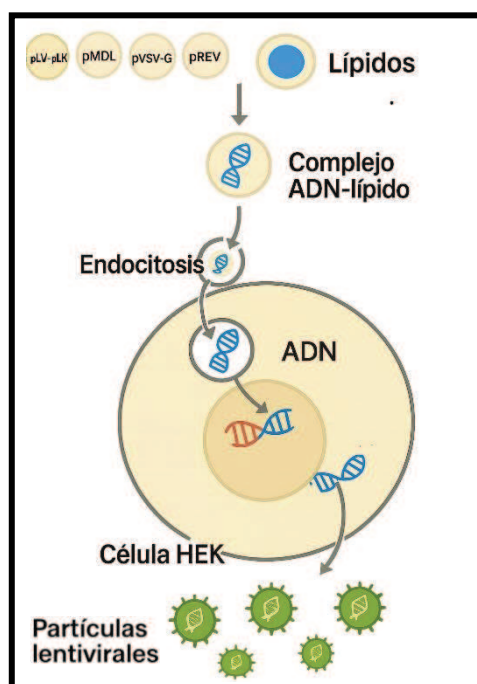


Figura 10: Transfección de células HEK 293T/17. Representación esquemática del proceso de transfección y generación de partículas lentivirales creada por IA Sora.

A continuación, se detalla el procedimiento llevado a cabo para la cotransfección:

- 1) Las células HEK 293T/17 se cultivaron a razón de 4×10^5 cél.mL⁻¹, en placas de 10 cm de diámetro, empleando medio DMEM para HEK suplementado con SFB 10% (v/v). Las células se incubaron ON a 37 °C, CO₂ 5%.
- 2) Al día siguiente, se preparó un tubo cónico con 2,5 mL de medio DMEM al que se le adicionaron 22,6 µL del reactivo FSM para lograr una relación de 1 µL de lípido por cada 1 µg de ADN. Se homogeneizó vigorosamente y se incubó a TA durante 5 min.
- 3) En otro tubo cónico con 2,5 mL de DMEM se adicionó el volumen necesario de la solución de cada vector para alcanzar las siguientes cantidades: 2,5 µg de pRSV-REV; 3,6 µg de pMD2.G; 6,5 µg de pMDLg/pRRE y 10 µg del vector de transferencia correspondiente.
- 4) Se mezcló el contenido de ambos tubos e incubó a TA durante 20 min.

- 5) A continuación, se retiró el sobrenadante de cultivo de las células HEK 293T/17 y se adicionaron los 5 mL de solución conteniendo los complejos lípido/ADN sobre la monocapa celular. Se incubó 4 h a 37 °C y CO₂ 5%.
- 6) Finalizado este período, se descartó el sobrenadante de cultivo y se adicionaron 10 mL de medio DMEM con SFB 10% (v/v). Se incubó durante 48 h a 37 °C y CO₂ 5%.
- 7) Posteriormente, se cosechó el sobrenadante de cultivo conteniendo las PLs, se centrifugó a 200 x *g* durante 10 min para retirar células eventualmente desprendidas de la monocapa y se fraccionó en alícuotas de 0,5 mL en tubos Eppendorf, conservándose a -70 °C.

5.8.3. Evaluación funcional de las PLs mediante expresión de GFP

Para obtener el título infeccioso, expresado en unidades de transducción por mL (UT.mL⁻¹), es necesario contar con un sistema que permita cuantificar únicamente las partículas lentivirales funcionales, es decir, aquellas capaces de transducir eficientemente las células. Dado que en nuestro laboratorio no se dispone de un método específico que cumpla con tales requisitos para los lentivirus de interés, se emplearon partículas lentivirales codificantes de GFP ensambladas en paralelo como control funcional. Esta proteína se caracteriza por emitir fluorescencia de color verde que puede ser detectada fácilmente por citometría. Es así que, para titular, se infectaron células HEK293T sembradas en placas de 24 pozos con diluciones seriadas del sobrenadante viral. A las 72 h postinfección se cuantificaron las células GFP⁺ mediante citometría de flujo.

5.8.4. Transducción de células de mamífero con PLs

La transducción es un proceso altamente eficiente, en el cual el transgén se integra establemente en el genoma de las células (Figura 11). Los vectores lentivirales pueden transducir tanto células en división como quiescentes; sin embargo, el proceso resulta más eficaz en células activas, ya que el estado abierto de la cromatina facilita la integración del material genético. Con el fin de obtener líneas celulares estables productoras de las variantes de interés, se transdujeron células sCHO empleando las PLs previamente generadas. Para ello, las células se cultivaron a una densidad celular relativamente baja, evitando alterar su ciclo de duplicación normal y promoviendo la entrada en división mitótica, lo que incrementa las probabilidades de contacto entre las PLs y las células, favoreciendo la transducción.

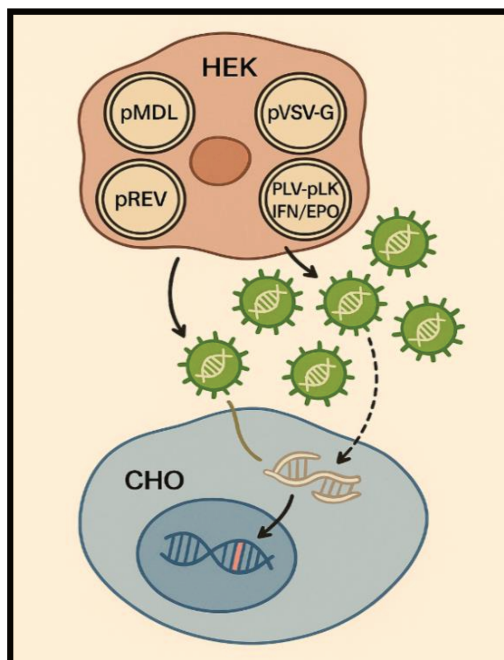


Figura 11: Transducción de células CHO-K1. Representación esquemática del proceso de transducción: generación de PLs y su uso posterior para la infección de células CHO-K1. Imagen creada por IA sora.

Para realizar este procedimiento se llevó a cabo el siguiente protocolo:

- 1) Las células sCHO se cultivaron en placas de 6 pozos ON a 37 °C, CO₂ 5%, a una densidad de $3,5 \times 10^4$ cél.mL⁻¹ en medio DMEM/F-12 suplementado con SFB 5% (v/v) para promover su adherencia.
- 2) Transcurridas 24 h, se removió el sobrenadante y se adicionó 1 mL de la cosecha de PLs, incubándose durante 24 h a 37 °C, CO₂ 5%.
- 3) Finalizado este intervalo, se removió el sobrenadante y se reemplazó por medio DMEM/F-12 suplementado con SFB 5% (v/v).
- 4) Luego de 72 h, se cosecharon los sobrenadantes, se centrifugaron a 100 x g durante 8 min y se conservaron a -20 °C.
- 5) Cuando las células alcanzaron un 90% de confluencia, se subcultivaron para realizar una nueva transducción en idénticas condiciones. Este procedimiento se repitió 4 veces, con el objetivo de incrementar el número de copias integradas al genoma y así favorecer una mayor productividad de la línea. Al momento del subcultivo, una alícuota de la suspensión celular se mantuvo sin transducir para evaluar la expresión de las proteínas en el sobrenadante.

5.8.5. Selección de células recombinantes

Las líneas transducidas 4 veces fueron sometidas a un proceso de presión selectiva con concentraciones crecientes del antibiótico puromicina para enriquecer el cultivo con las células

que presentan mayor expresión de la proteína de interés. La puromicina actúa inhibiendo la traducción al unirse al sitio A del ribosoma, interrumpiendo la síntesis proteica.

El proceso de selección se realizó en dos etapas:

1- Selección inicial: las células se sembraron a una densidad de 2×10^5 cél.mL⁻¹ en medio DMEM/F12 con SFS 5% (v/v) y puromicina entre 10 y 100 µg.mL⁻¹. Se seleccionó la condición de mejor crecimiento celular y mayor productividad de las variantes recombinantes de hIFN/hEPO (rhIFN/rhEPO).

2- Selección gradual: a partir de las líneas seleccionadas, se aplicaron incrementos progresivos de puromicina hasta alcanzar una concentración de 240 µg.mL⁻¹ (método gradual desarrollado en nuestro laboratorio, Prieto y col., 2011). Una vez adaptadas a cada condición, se realizaron subcultivos con mayor concentración de antibiótico, repitiendo el proceso hasta alcanzar el nivel de expresión deseado o evidenciar una caída de la productividad específica.

Finalizado el proceso de selección, se retiró el antibiótico del medio de cultivo para permitir la recuperación celular. Las líneas de mayor productividad fueron criopreservadas.

5.8.6. Adaptación de las células a crecimiento en suspensión

Las líneas seleccionadas fueron adaptadas a crecimiento en suspensión en medio libre de suero, un sistema preferido para la producción de proteínas recombinantes debido a su mayor escalabilidad, simplicidad en el procesamiento *upstream* y *downstream* y ausencia de componentes de origen animal que pueden introducir variabilidad entre lotes y patógenos adventicios. Se han desarrollado diversas metodologías para adaptar un cultivo desde su condición de adherencia. En el presente trabajo, se realizó de forma gradual en dos etapas:

1) Adaptación a medio libre de suero (medio EX-CELL® 302): mediante subcultivos sucesivos, se redujo gradualmente la concentración de SFB y se incrementó la proporción EX-CELL® 302, hasta alcanzar un 100% de este medio. Durante la transición, las células pasaron de crecer adheridas al sustrato a crecer en suspensión (a veces formando agregados), bajo agitación. Para ello, las líneas seleccionadas fueron sucesivamente subcultivadas utilizando las siguientes proporciones volumétricas de los medios DMEM/F12 5% SFB (v/v): EX-CELL® 302: 75:25 (5%), 50:50 (SFB 2,5%), 25:75 (SFB 1,25%), 15:85 (SFB 0,75%), 10:90 (SFB 0,5%) y 0:100 (SFB 0%).

2) Adaptación a medio PM: debido al elevado costo del medio EX-CELL® 302 y la necesidad de grandes volúmenes para la etapa de producción, se procedió a una segunda adaptación al medio PM, el cual ha demostrado buen rendimiento con otras líneas CHO recombinantes desarrolladas en nuestro laboratorio. La transición se realizó en un agitador orbital a 37 °C, 140 rpm y CO₂ 5%, empleando proporciones crecientes de PM: 25%, 50%, 75% y 100%.

El tiempo de exposición a cada condición fue clave para lograr una adaptación exitosa (Rodrigues y col., 2013). Se consideró que las líneas estaban adaptadas a la nueva condición de cultivo cuando mantenían una viabilidad superior al 90% durante 2 a 3 pasajes y una velocidad de duplicación sostenida incluso a baja densidad celular ($1,5 \times 10^5$ cél.mL⁻¹). Para ello, se monitorearon diariamente la viabilidad y densidad celular. Los cultivos en adherencia se subcultivaron al alcanzar la confluencia. En suspensión, las células se mantuvieron entre 1×10^6 cél.mL⁻¹ y 2×10^6 cél.mL⁻¹, ajustando la densidad mediante centrifugación o dilución con medio fresco, según fuera necesario. Se consideró completa la adaptación cuando el cultivo requería un recambio diario de al menos el 50% del volumen del medio.

5.8.7. Evaluación de la productividad específica

Para determinar la producción específica o productividad de las líneas celulares recombinantes en condiciones de adherencia, se cultivaron por duplicado en una placa de 24 pozos, a una densidad celular de 4×10^5 cél.ml⁻¹, incubándose durante 24 h a 37 °C en medio DMEM/F-12 suplementado con SFB 5% (v/v). Transcurrido ese tiempo, se realizó un recambio de medio de cultivo en uno de los pozos y en el otro se realizó el recuento celular (concentración inicial de células, C_i). La placa se incubó nuevamente a 37 °C durante 24 h. Se cosechó el sobrenadante del pozo restante, se centrifugó a 100 x g durante 8 min y se conservó a -20 °C. Además, se determinó la densidad celular (concentración final de células, C_f). Para calcular la productividad, se empleó la siguiente ecuación:

$$Productividad\ específica\ (ng.\ 10^6\ cél.^{-1}.\ día^{-1}) = \frac{C_{proteína}\ (ng.\ mL^{-1}) \times 10^6}{\frac{(C_f + C_i)}{2}\ (cél.\ mL^{-1}) \times t\ (días)} \quad (5)$$

Donde t es el tiempo de incubación (24 h) y $C_{proteína}$ corresponde a la concentración de proteína determinada por el ensayo de ELISA para la cuantificación de rhIFN (sección 8.3.1) o de rhEPO (sección 8.3.2).

Para las líneas en suspensión, el cultivo se centrifugó durante 8 min a 100 x g y el *pellet* se resuspendió en medio fresco. Posteriormente, la suspensión celular fue inoculada en un frasco Schott con 10 mL de medio PM en una densidad de 1×10^6 cél.mL⁻¹. Luego de 48 h a 37 °C en agitación, se cosecharon los sobrenadantes, se centrifugaron a 100 x g durante 8 min y se conservaron a -20 °C. La productividad específica se calculó de la misma forma que para los cultivos en adherencia, empleando la ecuación n°5.

5.8.8. Producción de proteínas recombinantes

La producción a mayor escala de las quimeras GMOP₃-IFN-GMOP, mGMOP₃-IFN-mGMOP, GMOP₃-EPO-GMOP y mGMOP₃-EPO-mGMOP se realizó en suspensión en frascos Schott de 1 L de capacidad, con 200 ml de cada cultivo. Para ello, las líneas celulares sCHO recombinantes adaptadas al crecimiento en suspensión se inocularon en medio PM a una densidad de 1×10^6 cél.mL⁻¹. Una vez que los cultivos alcanzaron la fase estacionaria, se cosechó el sobrenadante cada 48 - 72 h, reemplazándolo por medio fresco. Estas condiciones de cultivo fueron previamente optimizadas en el laboratorio con el fin de maximizar la producción acumulada de las variantes, minimizando al mismo tiempo la concentración de contaminantes proteicos.

Los sobrenadantes se centrifugaron 10 min a $200 \times g$ y se conservaron a -20 °C hasta su purificación. Se realizaron 12 cosechas de cada variante, reservando un alícuota para su cuantificación mediante la técnica de ELISA correspondiente (Secciones 8.3.1 y 8.3.2).

6. OBTENCIÓN DE REACTIVOS PARA PURIFICACIÓN Y ANÁLISIS

6.1. mAb CC1H7

6.1.1. Adaptación del hibridoma productor del mAb

La adaptación del hibridoma al cultivo en medio sin SFB consistió en dos etapas:

1- Reducción gradual del SFB: se redujo progresivamente la concentración de SFB en el medio, desde 20% (v/v) hasta 1,25% (v/v), cultivando los hibridomas en placas de 6 pozos, a una densidad inicial de 3×10^5 cél.mL⁻¹ en medio DMEM suplementado con concentraciones decrecientes de SFB: 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1,25% (v/v). En cada condición, las células se mantuvieron durante al menos 3 pasajes y, transcurrido dicho tiempo, se generó un banco de trabajo de resguardo (Caron y col., 2018; Manna y col., 2015).

2- Adaptación directa a medio libre de suero en agitación: una vez que la concentración de SFB estuvo en 1,25 % (v/v), se reemplazó completamente el medio por el medio libre de suero (SFM, del inglés *serum free medium*), compuesto por 50% DMEM- 50% EX-CELL® 620, y se cultivó en agitación. Este protocolo, conocido como "*Do-or-die approach*" (Klausing, 2022) suele tener una eficacia menor, pero presenta la ventaja de ser más rápido (Marigliani y col., 2019) y ha demostrado mantener una tasa de crecimiento adecuada, niveles de productividad comparables a los obtenidos en cultivos suplementados con 20% (v/v) de SFB y conservación de la afinidad aparente inicial del mAb (Wandel-Petersen y col., 2021). Para ello, se partió de cultivos en fase de crecimiento exponencial y viabilidad superior al 90%, que fueron centrifugados 10 min a $200 \times g$ y resuspendidos en SFM a alta densidad (6×10^5 cél.mL⁻¹). Esta condición favorece la presencia de factores de crecimiento autócrinos y mejora la supervivencia celular (Min Lee y col., 1989). Se consideró que el hibridoma se encontraba adaptado a la nueva condición cuando se observó un mantenimiento de la

viabilidad superior a 90% durante 2-3 pasajes, una capacidad de duplicación incluso a baja densidad ($1,5 \times 10^5$ cél.mL⁻¹) y la conservación de reactividad del mAb producido (Marigliani y col., 2019).

6.1.2. Producción del mAb

La producción del mAb CC1H7 a una escala mayor se llevó a cabo mediante el cultivo del clon del hibridoma adaptado al crecimiento en suspensión en modo *batch*, empleando frascos tipo Schott de 1 L con 300 mL de volumen de trabajo, inoculados a una densidad de 4×10^5 cél.mL⁻¹. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C, CO₂ 5% en un incubador orbital con una agitación de 140 rpm. A las 96 h se cosechó la mitad del cultivo, reemplazándolo por medio fresco. Al séptimo día se realizó la cosecha total. Los sobrenadantes se clarificaron por centrifugación (10 min a 4000 x g) y filtración (filtros Millipore de 0,45 µm) y se almacenaron a -20 °C hasta su purificación mediante cromatografía de afinidad a proteína A.

6.1.3. Titulación del mAb mediante ELISA específico indirecto

Los sobrenadantes de cultivo obtenidos al inicio y al final del proceso de adaptación, conteniendo el mAb CC1H7 fueron titulados, con el objetivo de calcular el parámetro CE50 (concentración efectiva 50 o concentración que produce el 50% de unión con respecto a la máxima señal alcanzada). Este valor se emplea como un estimador de la afinidad del anticuerpo producido en las diferentes condiciones de adaptación de los hibridomas al medio libre de SFB. El protocolo utilizado se detalla a continuación:

- 1) Sensibilización:** Se sensibilizaron placas de poliestireno de fondo plano de 96 pozos con 50 ng.pozo⁻¹ de rhGM-CSF diluido en 100 µL de solución de sensibilización. Se incubó 1 h a 37 °C y toda la noche a 4 °C.
- 2) Bloqueo:** Los sitios de interacción inespecífica se bloquearon con 200 µL por pozo de solución de bloqueo N°1. La placa se incubó 1 h a 37 °C.
- 3) Primera incubación:** Se agregaron 100 µL por pozo de diluciones sucesivas al medio de los sobrenadantes de cultivo de hibridomas en solución diluyente N°1, incubándose 1 h a 37 °C. Se realizaron controles negativos para evaluar la posible unión inespecífica de los reactivos. Para ello, se incubaron 4-6 pozos con 100 µL de diluyente N°1.
- 4) Segunda incubación:** Se adicionaron 100 µL por pozo de anticuerpos de conejo anti-inmunoglobulinas (Igs) murinas conjugados con la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP, *horseradish peroxidase*) en una dilución 1:1000 en solución diluyente N°1 durante 1 h a 37 °C.

La HRP permite la detección cromogénica mediante transformación de un sustrato incoloro en un producto coloreado.

5) Revelado: Se agregaron 100 μL por pozo de solución de revelado. Se incubó en oscuridad durante 15- 30 min a TA. La aparición de un color amarillo-anaranjado indicó la oxidación del cromógeno. La reacción se detuvo mediante el agregado de 50 μL por pozo de H_2SO_4 2 N y se realizó la lectura de absorbancia a $\lambda=492$ nm en un lector de placas (Labsystems Multiskan® MCC/340).

6) Cuantificación: Se graficaron los valores de absorbancia en función de las diluciones de los sobrenadantes. La CE50 se calculó como la concentración de anticuerpo que produjo una absorbancia equivalente 50% de la señal máxima.

Todas las incubaciones se llevaron a cabo en cámara húmeda. Luego de cada etapa, se realizaron seis lavados con solución de lavado.

-
- **Buffer de sensibilización:** $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 50 mM, pH 9,6.
 - **Solución de bloqueo N°1:** SFB 5% (v/v) en PBS.
 - **Diluyente N°1:** SFB 0,5% (v/v) en PBS, Tween 20 0,05% (v/v).
 - **Solución de revelado:** Citrato/fosfato de sodio 50 mM, pH 5,3, H_2O_2 0,015 volúmenes, O-fenilendiamina (OPD) 0,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.
 - **Solución de lavado:** Tween 20 0,05% (v/v) en PBS.

6.1.4. Cuantificación del mAb mediante ELISA sándwich

Para la cuantificación de anticuerpos en sobrenadantes de cultivos se empleó la técnica de ELISA sándwich que se describe a continuación:

1) Sensibilización: Se sensibilizaron placas de poliestireno de fondo plano de 96 pozos con 4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (400 ng por pozo) de anticuerpos policlonales de conejo anti-Igs murinas purificados en 100 μL de solución de sensibilización. Se incubó 1 h a 37 °C y toda la noche a 4 °C.

2) Bloqueo: El bloqueo de los sitios de interacción inespecífica se realizó con 200 μL por pozo de solución de bloqueo N°2. Se incubó 1 h a 37 °C.

3) Primera incubación: Se agregaron 100 μL de diluciones sucesivas al medio del estándar de mAb CC1H7 desde una concentración de 500 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ hasta 3,9 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, preparadas en solución diluyente N°2. 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. La incubación se realizó 1 h a 37 °C. Se realizaron controles negativos, sembrándose 100 µL de solución diluyente N°2 por pozo.
- 4) Segura incubación:** Se adicionaron 100 µL por pozo de anticuerpos de conejo anti-IgG murinas conjugados con HRP en una dilución 1:1000 en solución diluyente 2 durante 1 h a 37 °C.
- 5) Revelado:** Se repitió el procedimiento detallado en la sección 6.1.3.
- 6) Cuantificación:** Se graficaron los valores de absorbancia en función de las concentraciones del mAb empleado como estándar y de las diluciones de las muestras en escala logarítmica. La concentración de las muestras se determinó mediante la interpolación de sus valores de absorbancia en la curva estándar ajustada.

Todas las incubaciones se llevaron a cabo en cámara húmeda. Después de cada etapa se realizaron seis lavados con solución de lavado.

-
- **Solución de bloqueo N°2:** Leche descremada 2% (p/v), Tween 20 0,5% (v/v) en PBS.
 - **Diluyente N°2:** Leche descremada 0,2% (p/v), Tween 20 0,05% (v/v) en PBS.

6.1.5. Purificación del mAb por cromatografía de afinidad a proteína A

La cromatografía de afinidad, desarrollada en 1968 (Cuatrecasas y col., 1968) permite la separación y purificación de analitos específicos presentes en una muestra mediante interacciones biológicas altamente selectivas. Esta estrategia se utilizó para purificar el mAb CC1H7 en un único paso a partir de sobrenadantes de cultivo clarificados. Se emplearon 5 mL de resina de proteína A (MabSelect SuRe LX™, GE Healthcare) y un sistema ÄKTA™ Start (GE Healthcare). La metodología aplicada fue adaptada de (Harlow y Lane, 1988) y se detalla a continuación:

- 1) Empaquetado:** Se empaquetaron 5 mL de resina MabSelect SuRe LX™ en una columna XK 16/20 (2,5 cm de altura x 1,6 cm de diámetro interno, GE Healthcare).
- 2) Equilibrado:** La matriz se equilibró con 5 volúmenes de columna (VC) de solución de equilibrado a un flujo de 1,2 mL.min⁻¹. Se verificó que el pH a la salida de la columna fuese igual al de la solución de equilibrado.
- 3) Acondicionamiento de la muestra:** El sobrenadante clarificado se acondicionó con NaCl 3 M y Tris/HCl 1 M para lograr un pH 9, se centrifugó 10 min a 4000 x g durante 10 min y se clarificó mediante un módulo de filtración conectado a un sistema de vacío y filtros de 0,45 µm.

- 4) Siembra:** La muestra acondicionada se aplicó a la matriz, respetando la capacidad máxima indicada por el fabricante (60 mg de anticuerpo por mL de resina), a un flujo de 1 mL.min⁻¹. El *flowthrough* (FT) se recolectó para su posterior análisis.
- 5) Lavado N°1:** Las proteínas no retenidas por la matriz fueron eliminadas mediante lavado con 5 VC de solución de equilibrado hasta demostrar la ausencia de proteínas por medición de absorbancia a $\lambda=280$ nm. El lavado se recolectó en una única fracción.
- 6) Elución:** Las Igs retenidas fueron eluidas mediante el descenso del pH del lecho cromatográfico, empleando 10 VC de solución de elución a un flujo de 1 mL.min⁻¹. Se recolectaron fracciones de 2,5 mL y se neutralizaron con Tris/HCl 1 M, pH 9, conservándose a -20 °C para su posterior análisis.
- 7) Lavado N°2:** Para neutralizar el pH de la resina cromatográfica, se lavó con 5 VC de solución de lavado a un flujo de 1,2 mL.min⁻¹.
- 8) CIP:** Con el fin de eliminar posibles restos de proteína retenidos en la columna, se realizó un lavado con 2 VC de solución de CIP (del inglés *cleaning in place*) a un flujo de 1,0 mL.min⁻¹.
- 9) Lavado N°3** Se realizó un último lavado con 5 VC de solución de lavado para remover el NaOH remanente, eliminar restos de Igs y neutralizar la resina cromatográfica a un flujo de 1,2 mL.min⁻¹.
- 10) Conservante:** La resina se almacenó en conservante a 4-8 °C para su reutilización.

Una vez finalizado el proceso cromatográfico, se juntaron las fracciones correspondientes al pico de elución, y se determinó la concentración de anticuerpos mediante lectura espectrofotométrica a $\lambda=280$ nm (sección 6.1.6). La pureza de los anticuerpos se evaluó mediante SDS-PAGE seguido de tinción con colorante azul brillante de *Coomasie* (sección 6.17). Finalmente, el eluato fue dializado contra solución de acoplamiento para su inmovilización en resinas de IAF, o bien contra PBS para su uso como reactivo de detección y de cuantificación en técnicas analíticas.

-
- **Equilibrado:** Tris/HCl 50 mM, NaCl 3 M, pH 9.
 - **Solución de elución:** Ácido cítrico/NaOH 0,1 M, pH 3.
 - **Solución de lavado:** Fosfato de sodio 20 mM, pH 7.
 - **Solución de CIP:** NaOH 0,1 M – NaCl 1 M
 - **Conservante:** Etanol 20% (v/v) en fosfato de sodio 20 mM, pH 7.

6.1.6. Determinación de la concentración del mAb purificado

La concentración del mAb purificado se determinó en forma directa mediante medición espectrofotométrica a $\lambda=280$ nm, empleando un espectrofotómetro UV-visible (Ultrospec 2000, GE Healthcare) y cubetas de cristal de cuarzo. Se empleó como blanco de lectura la solución de diálisis. Las lecturas de absorbancia obtenidas se utilizaron para la cuantificación, aplicando la siguiente ecuación:

$$c \left(\frac{mg}{mL} \right) = \frac{(A_m - A_b)}{a \left(\frac{mg}{mL \cdot cm} \right) \times L (cm)} \quad (6)$$

Donde C es la concentración calculada; A_m y A_b representan las lecturas de absorbancia a $\lambda=280$ nm de la muestra y el blanco respectivamente; a la absortividad específica (siendo de $0,8 \text{ mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para el mAb; y L el camino óptico (1 cm).

6.1.7. Determinación de la pureza mediante SDS-PAGE

La pureza del mAb se evaluó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) con posterior coloración con azul brillante de *Coomasie*, siguiendo el método descrito por Laemmli en 1970. Se utilizó el sistema de electroforesis modular vertical Mini-Protean III (Bio-Rad), preparándose geles discontinuos constituidos por un gel de apilamiento al 5% (p/v) y un gel de separación al 12% (p/v) de acrilamida/bisacrilamida, en condiciones desnaturizantes obtenidas mediante el agregado del detergente iónico dodecil sulfato de sodio (SDS) y un agente reductor de enlaces disulfuro (β -mercaptoetanol). Las muestras se acondicionaron adicionándoles la solución de siembra en una proporción 4:1 e incubándolas a 100 °C durante 5 min para favorecer la desnaturización. La corrida electroforética se llevó a cabo empleando solución de corrida, a un voltaje constante de 200 V con el módulo sumergido en baño de hielo, hasta que el frente de corrida alcanzó 0,5 cm del borde inferior del gel de separación.

Finalizada la corrida, los geles se lavaron 3 veces con agua durante 5 min para eliminar el SDS y se tiñeron sumergiendo el gel durante 15 min en solución de azul brillante de *Coomasie*. Posteriormente, se incubaron con solución decolorante durante 5 min para disminuir la tinción de fondo y permitir una visualización clara de las bandas. Finalmente, se almacenaron en solución de conservación que también actúa como decolorante, favoreciendo la aparición de bandas nítidas y la disminución de la tinción de fondo. Todas las incubaciones se realizaron en agitación a TA.

El porcentaje de pureza se calculó mediante cuantificación relativa de la intensidad de las bandas utilizando el software GelAnalyzer 23.1⁵.

-
- **Solución de siembra:** Tris/HCl 200 mM, SDS 8% (p/v), glicerol 40% (v/v), β -mercaptoetanol 10% (v/v), azul de bromofenol 0,2% (p/v), pH 6,8.
 - **Solución de corrida:** Tris/HCl 25 mM, glicina 0,2 M, SDS 0,1% (v/v).
 - **Azul de Coomassie:** Coomassie R-2500 0,125% (p/v), etanol 45% (v/v) y ácido acético 10% (v/v).
 - **Decolorante:** Etanol 45% (v/v), ácido acético 10% (v/v).
 - **Conservación:** Etanol 10% (v/v), ácido acético 10% (v/v).

6.2. mAb CA5E6

El mAb CA5E6 es una inmunoglobulina del subtipo IgG₁, obtenida y caracterizada a partir de hibridomas productores desarrollados previamente en el Laboratorio de Cultivos Celulares mediante la fusión de células del bazo de un ratón inmunizado con rhIFN- α 2b y células NS0 de mieloma murino (derivadas de la cepa BALB/c) no secretoras de inmunoglobulinas, en una proporción 10:1 (Casalis y col., 2004). Al inicio de la presente tesis, el laboratorio disponía de mAb CA5E6 purificado a partir de líquido ascítico murino. Este anticuerpo fue empleado tanto para su inmovilización en una matriz de *Sepharose*, con el fin de ser utilizado como ligando en cromatografía de inmunoafinidad, como también como reactivo en ensayos inmunoquímicos para la detección o cuantificación de rhIFN- α 2b. Dichos ensayos se usaron como sistema de referencia para evaluar las metodologías desarrolladas con el mAb CC1H7 (sección 7).

6.3. mAb 2B2

El mAb 2B2, previamente producido y purificado en nuestro laboratorio, fue generado a partir de hibridomas obtenidos mediante la inmunización de ratones de la cepa BALB/c con rhEPO (Amadeo y col., 2004), El clon 2B2 secreta anticuerpos anti-rhEPO capaces de reconocer tanto la forma nativa como desnaturalizada de la rhEPO, así como a todas las glicofomas y las variantes de rhEPO generadas en nuestro laboratorio (Bürgi y col., 2021). En el presente trabajo, el mAb 2B2 disponible fue utilizado para la cuantificación de las variantes de hEPO mediante técnicas inmunoquímicas.

7. PUESTA A PUNTO DEL SISTEMA mGMOP-mAb CC1H7

Para explotar la interacción epítopo APAR y el mAb CC1H7, se llevó a cabo la puesta a punto de un proceso cromatográfico y de técnicas analíticas para la detección y cuantificación de

⁵ www.gelalyzer.com

proteínas que contienen dicho epítopo. Como modelos para llevar a cabo la optimización, se seleccionaron dos proteínas de fusión:

- mGMOP-IFN: obtenida previamente en el laboratorio (Sales y col., 2021), contiene una única copia del péptido.
- mGMOP₃-IFN-mGMOP: obtenida en este trabajo, contiene cuatro copias del péptido, tres de ellas en el extremo N y una en el C.

7.1. Desarrollo de una cromatografía de inmunoafinidad (CIA)

La CIA se caracteriza por contener, en la fase estacionaria, un anticuerpo o una parte de este. La posibilidad de obtener anticuerpos contra una gran variedad de antígenos ha convertido esta técnica en una herramienta muy poderosa para el aislamiento de un gran número de proteínas y compuestos biológicos (Hage, 1998). Asimismo, la alta selectividad de los anticuerpos hace que, bajo condiciones adecuadas, se puedan obtener factores de purificación entre 1000 y 5000 veces y con recuperaciones cercanas al 90% en un único paso. Para el diseño exitoso de cualquier plataforma de IAF, es esencial optimizar ciertos parámetros experimentales críticos, tales como (Fitzgerald y col., 2017):

- 1) El soporte de matriz donde se inmoviliza el anticuerpo
- 2) La interacción entre el par de afinidad biológica (unión del antígeno al anticuerpo)
- 3) Las condiciones de elución del antígeno de la matriz

Todas las purificaciones de las variantes se llevaron a cabo en el cromatógrafo líquido ÄKTA purifier (GE Healthcare), equipado con un sistema de bombas (P-900), un colector automático de fracciones (FRAC-900), un detector de absorbancia (UV-900) y un medidor de pH y conductividad (PH/C-900).

7.1.1. Preparación de la matriz: inmovilización del mAb CC1H7 a una resina de *Sepharose* activada con bromuro de cianógeno (CNBr)

El mAb purificado se acopló a una matriz de *Sepharose*TM 4B *Fast Flow* activada CNBr, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante, empleando la solución de acoplamiento. Se prepararon 27 mL de resina. El porcentaje de mAb acoplado a la resina se calculó midiendo la concentración de Igs en la solución antes y después de la reacción de acoplamiento. La capacidad teórica de unión de la matriz CC1H7-*Sepharose* se estimó teniendo en cuenta la masa de anticuerpo unido (porcentaje de acoplamiento), asumiendo que cada molécula de IgG (~150 KDa) unida al soporte tiene la capacidad de ligar al menos una molécula que contenga el epítopo APAR.

De esta manera, la capacidad teórica de la matriz se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Capacidad teórica (mg IFN)} = \frac{\text{masa de mAb (mg)} \times \text{MM prot (mg.mmol}^{-1}\text{)}}{150.000 \text{ mg.mmol}^{-1}} \quad (7)$$

Donde *masa de mAb* es la masa del anticuerpo inmovilizado en la matriz (expresada en mg), calculada a partir de la eficiencia de acoplamiento, y *MM prot* es la masa molecular de la proteína.

- **Solución de acoplamiento:** NaCl 0,5 M, NaHCO₃ 0,1 M, pH 8,3.

7.1.2. Optimización de las condiciones de unión

7.1.2.1. Selección de sales y evaluación de su influencia sobre la interacción mAb CC1H7-mGMOP

Estudios preliminares realizados en el laboratorio demostraron que la interacción entre el mAb CC1H7 y el epítopo APARSPS es modulada por condiciones de alta fuerza iónica (Perotti y col., 2013).

En función de ello, se seleccionaron diferentes sales con el propósito de realizar un *screening* orientado a evaluar el efecto de cada una de ellas sobre el incremento de afinidad del mAb por su epítopo, en comparación con la condición control en diluyente. Los ensayos se llevaron a cabo mediante ELISA sándwich a pH neutro (pH=7), como se describe a continuación:

- 1) Sensibilización:** Se sensibilizaron placas de poliestireno de fondo plano de 96 pozos con 0,5 µg.mL⁻¹ (50 ng por pozo) del mAb CC1H7 en 100 µL de solución de sensibilización. Se incubó 1 h a 37 °C y toda la noche a 4 °C.
- 2) Bloqueo:** El bloqueo de los sitios de interacción inespecífica se realizó con 200 µL por pozo de solución de bloqueo N°2. Se incubó 1 h a 37 °C.
- 3) Primera incubación:** Se agregaron 100 µL de diluciones sucesivas al medio de mGMOP-IFN a diferentes concentraciones en presencia de las sales seleccionadas. La incubación se realizó durante 1 h a 37 °C. Como referencia, se utilizó mGMOP-IFN en diluyente N°2.
- 4) Segunda incubación:** Se adicionaron 100 µL por pozo de anticuerpos policlonales de conejo anti-rhIFN-α2b en una dilución 1:1000 en solución diluyente N°2 durante 1 h a 37 °C.
- 5) Tercera incubación:** Se adicionaron 100 µL por pozo de inmunoglobulinas de cabra anti-conejo conjugadas a HRP en una dilución 1:2000 en solución diluyente N°2 durante 1 h a 37 °C.

- 6) Revelado:** Se repitió el procedimiento detallado en la sección 6.1.3.
- 7) Cuantificación:** Se graficaron los valores de absorbancia en función de las concentraciones de proteína. Para cada condición experimental, la afinidad aparente se estimó comparando la concentración de proteína necesaria para alcanzar un mismo valor de absorbancia respecto de la condición control en diluyente, de acuerdo a lo indicado en la ecuación 8.

$$Afinidad\ aparente = \frac{1}{\frac{[Proteína_{Condición\ con\ sal}]}{1}} \quad (8)$$

$$\frac{1}{\frac{[Proteína_{Control\ sin\ sal}]}{1}}$$

Todas las incubaciones se llevaron a cabo en cámara húmeda. Después de cada etapa se realizaron seis lavados con solución de lavado.

Las sales seleccionadas se evaluaron en cuanto a su solubilidad en sobrenadantes de cultivo a 4 °C, en un rango de concentraciones de 0,5 M a 8 M. Las concentraciones máximas se definieron en función de la conductividad alcanzada y la ausencia de precipitación visible.

7.1.2.2. Optimización de las condiciones de unión mediante diseño de experimentos (DoE)

A partir de la selección de las sales, se llevó a cabo un DoE factorial de tres niveles para optimizar su concentración y el pH del medio, con el objetivo de maximizar la unión entre mGMOP y el mAb CC1H7. Para cada sal evaluada, se consideraron estos dos factores: pH, en un rango de 6 a 8, y concentración, definida en función al *screening* previo cuya metodología se describe en la sección 7.1.2.1.

Cada sal seleccionada fue sometida a un DoE independiente, con un total de 12 corridas por diseño, incluyendo 9 tratamientos únicos y 3 réplicas del punto central. Como variable de respuesta, se utilizó el incremento en la afinidad aparente de la interacción mGMOP-mAb, determinado mediante el ensayo de ELISA sándwich de la sección 7.1.2.1. Los datos obtenidos se modelaron con el *software* Design-Expert 7.0, con el fin de generar superficies de respuesta e identificar las condiciones óptimas de tipo de sal, concentración y pH.

7.1.2.3. Capacidad dinámica

Se construyeron curvas de *breakthrough* para evaluar la unión de mGMOP al mAb CC1H7 bajo las condiciones seleccionadas mediante el DoE (sección 7.1.2.2) y se compararon con una condición control sin sal.

Para ello, se utilizó la matriz de IAF *Sepharose*-mAb CC1H7 previamente preparada y empaquetada en columna XK 16/20 (2,5 cm de altura x 1,6 cm de diámetro interno). Se equilibró con 8 VC de solución de equilibrado (Tris-HCl 25 mM), ajustado en concentración de sal y pH según las condiciones definidas por el DoE). El volumen de sobrenadante de cultivo que contenía la masa de proteína necesaria para alcanzar la capacidad teórica de unión fue acondicionado en las mismas condiciones de sal y pH. Posteriormente, se cargó en la columna a un flujo de 1 mL.min⁻¹, se recolectaron las fracciones de FT y se determinaron las concentraciones de cada variante tanto en el FT como en la muestra cargada mediante un ELISA tipo sándwich específico para rhIFN (sección 8.3.1). Se graficó la razón entre la concentración en cada fracción de FT (C) y la concentración de la muestra cargada (C₀) en función del volumen de elución. A partir de esta curva, se calculó la Capacidad Dinámica de Unión (DBC, del inglés *dynamic binding capacity*) de la matriz para una razón C/C₀ de 0.1

7.1.2.4. Determinación de la constante de afinidad (K_A) del mAb CC1H7 en las condiciones definidas

Las K_A de los complejos entre el mAb CC1H7 y las variantes de rhIFN se determinaron mediante ELISA de competición, considerando la bivalencia del anticuerpo, según lo descrito por Friguet y col. (1985), lo que permite medir la constante una vez que el complejo alcanza el equilibrio. Se describe el ensayo a continuación:

- 1) Preparación del complejo:** Se prepararon soluciones de las variantes de rhIFN en concentraciones entre 10 µg·mL⁻¹ y 156 ng·mL⁻¹, y se preincubaron toda la noche a TA con una concentración constante de mAb. Las incubaciones se realizaron en presencia o ausencia de 1 M de Na₂SO₄ para evaluar los efectos de la fuerza iónica sobre la asociación.
- 2) Sensibilización:** Se sensibilizaron placas de poliestireno de fondo plano de 96 pozos con 0,5 µg·mL⁻¹ (50 ng por pozo) de la variante de rhIFN a evaluar en 100 µL de solución de sensibilización. Se incubó 1 h a 37 °C y toda la noche a 4 °C.
- 3) Bloqueo:** El bloqueo se realizó con 200 µL por pozo de solución de bloqueo N°1. Se incubó 1 h a 37 °C.
- 4) Primera incubación:** Se añadieron 100 µl por pozo de los complejos preformados toda la noche a TA, por triplicado. Además, se incubó el mAb CC1H7 sin antígeno soluble para obtener la señal máxima. Se incluyeron controles negativos sin complejo y blancos de reactivos. Se incubó 1 h a 37 °C.

- 5) Segunda incubación:** Se adicionaron 100 μ L por pozo de anticuerpos de conejo anti-ratón conjugados con HRP en una dilución 1:2000 en solución diluyente N°1 durante 1 h a 37 °C.
- 6) Revelado:** Se repitió el procedimiento detallado en la sección 6.1.3.
- 7) Cuantificación:** Los datos experimentales se analizaron mediante una representación de Scatchard, graficando la relación f/a en función de la concentración de antígeno libre en equilibrio (a), con el fin de determinar la constante de disociación (K_D) del anticuerpo bivalente. El análisis se realizó de acuerdo con la ecuación 9:

$$\frac{f}{a} = \frac{1}{K_D} - \frac{1}{K_D} f \quad (9)$$

donde f representa la fracción de sitios de unión ocupados y a la concentración de antígeno libre en equilibrio. El valor de K_D se obtuvo a partir de la pendiente de la recta resultante. La constante de afinidad K_A se calculó como el inverso de K_D .

Todas las incubaciones, excepto la de los complejos, se llevaron a cabo en cámara húmeda. Después de cada etapa se realizaron seis lavados con solución de lavado.

7.1.3. Optimización de las condiciones de elución

7.1.3.1. Estabilidad del mAb CC1H7 frente a potenciales soluciones de elución

Para verificar que el mAb CC1H7 conserve su capacidad de unión específica durante el proceso de purificación y evitar pérdidas en la captura de la proteína diana, se evaluó su estabilidad frente a diferentes soluciones de elución. Para ello, se realizó un ensayo de ELISA tipo sándwich similar al descrito en la sección 7.1.2.1, siguiendo los mismos pasos de sensibilización y bloqueo. Antes de añadir la proteína de interés, el anticuerpo se incubó con las siguientes soluciones: MgCl₂ 3 M; LiCl 5 M; etilenglicol 25 % (v/v); SDS 0,5 % (v/v); NaSCN 0,5 M; guanidina 2 M; urea 2 M; agua Milli-Q; fosfato de sodio 50 mM (pH 9, pH 10 y pH 11) y glicina 100 mM (pH 2). Se incluyó PBS como control. Las incubaciones se realizaron a TA durante 25 y 60 min, completando el procedimiento de ELISA según lo detallado previamente. En este ensayo se empleó mGMOP-IFN como muestra para determinar la estabilidad de unión. La capacidad de unión del mAb CC1H7 a la variante de rhIFN, luego de cada tratamiento, se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$Unión (\%) = 100 \times \frac{[Proteína]_{SE}}{[Proteína]_{PBS}} \quad (10)$$

Donde $[Proteína]_{SE}$ representa la concentración correspondiente a la unión del antígeno tras la incubación con la solución ensayada (SE) y $[Proteína]_{PBS}$ a la concentración obtenida durante la unión del mAb al antígeno en PBS, ambas medidas a la misma absorbancia.

7.1.3.2. Análisis del poder de elución de diferentes soluciones

El desempeño de las soluciones evaluadas como medio de elución para la purificación de variantes mediante CIA fue evaluado mediante un ELISA tipo sándwich que simula el proceso elutorio. El inmunoensayo se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Perotti y col. (2013). En resumen, luego de la captura de las variantes de rhIFN por el mAb CC1H7 inmovilizado en microplacas, se realizó una incubación de 1 h con los agentes de elución en estudio. Posteriormente, el rhIFN que permaneció unido al mAb fue detectado siguiendo los pasos descritos en la sección 6.1.3. Finalmente, se calculó el porcentaje de retención, definido como la concentración promedio de proteína en cada solución ensayada ($[Proteína]_{SE}$) a una absorbancia específica, normalizada respecto a la concentración máxima de unión observada en el control positivo ($[Proteína]_{Control}$), a la misma absorbancia:

$$Retención (\%) = 100 \times \frac{[Proteína]_{SE}}{[Proteína]_{Control}} \quad (11)$$

7.1.4. Purificación de las variantes por CIA empleando la resina mAb CC1H7-Sepharose

Considerando la influencia de la fuerza iónica en la interacción entre el epitope APARSPS y su paratope en el mAb CC1H7, así como las condiciones de unión y elución determinadas en los apartados anteriores, se estableció el siguiente protocolo:

- 1) Empaquetado:** Se empaquetó un volumen de 4 mL de la matriz mAb CC1H7-Sepharose™ 4B Fast Flow activada con CNBr en una columna XK 16/20.
- 2) Equilibrado:** La matriz se equilibró con 8 VC de solución de equilibrado, verificando que el pH a la salida de la columna fuese igual al de la solución de equilibrado.
- 3) Acondicionamiento de la muestra:** Los sobrenadantes que contenían rhIFN se suplementaron con Na_2SO_4 1 M y se ajustaron a pH 8 para igualar las condiciones de equilibrado. Luego, se filtraron mediante un módulo Nalgene conectado a vacío y membranas de 0,45 μm (Millipore, Merck).

- 4) Siembra:** Se sembraron 200 mL de muestra acondicionada a la matriz a un flujo de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, respetando la capacidad máxima calculada. El FT se recolectó en un único tubo cónico para su posterior análisis.
- 5) Lavado:** Las proteínas no retenidas fueron eliminadas mediante lavado con 10 VC de la solución de equilibrado hasta verificar la ausencia de proteínas por medición espectrofotométrica a $\lambda=280 \text{ nm}$. El lavado se recolectó en una única fracción para su posterior análisis.
- 6) Elución:** La proteína de interés fue eluida mediante aumento del pH del lecho cromatográfico y descenso de la fuerza iónica. Se recolectaron fracciones de 2 mL sobre solución de neutralización para lograr un pH neutro.
- 7) Conservante:** La resina se almacenó en conservante a $4-8 \text{ }^\circ\text{C}$, para su uso posterior.

Durante todas las etapas del proceso cromatográfico se empleó un flujo constante de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Todas las fracciones (siembra, FT, lavado y elución) fueron analizadas mediante el ELISA sándwich descrito en la sección 8.3.1, calculando el rendimiento o recuperación ($R(\%)$) según la ecuación (9), donde M_f representa la masa de proteína de interés recuperada en el proceso cromatográfico y M_i , la masa inicial presente en la muestra:

$$R(\%) = \frac{M_f}{M_i} \times 100 \quad (12)$$

Las variantes purificadas se concentraron y diafiltraron contra PBS utilizando unidades de filtración para centrifuga de 10 kDa. La pureza se evaluó por SDS-PAGE (sección 6.1.7).

-
- **Equilibrado y lavado:** Tris/HCl 25 mM I, Na_2SO_4 1 M, pH 8
 - **Buffer de elución:** Fosfato de sodio 50 mM, pH 11.
 - **Solución de neutralización:** Glicina 100 mM, pH 2.
 - **Conservante:** Etanol 20% (v/v) en fosfato de sodio 20 mM, pH 7.

7.2. Diseño y optimización de un ELISA de competición

Se desarrolló un ELISA de competición para cuantificar proteínas fusionadas al péptido mGMOP, midiendo la capacidad de variantes con una o más copias del péptido en solución para competir por la unión al mAAb CC1H7 con una proteína de fusión que contiene una copia o cuatro copias de mGMOP, inmovilizada en fase sólida. Para optimizar las condiciones el ensayo, se aplicó la metodología de superficie de respuesta (RSM), basada en un DoE de tipo Box Behnken (BBD, del inglés *Box Behnken Design*) con tres niveles y tres factores. Se diseñaron experimentos independientes para mGMOP-IFN y mGMOP₃-IFN-mGMOP,

evaluando el efecto de la masa de proteína utilizada para sensibilizar la placa, el tiempo de incubación del complejo y la dilución del conjugado. Se llevaron a cabo 17 corridas experimentales, con quintuplicado en el punto central. Los niveles de cada factor se seleccionaron en función de resultados preliminares.

El protocolo llevado a cabo se presenta a continuación:

- 1) Preparación de los complejos:** Los complejos se prepararon como se describe en la sección 7.1.2.4 y se incubaron en PBS con SFB 0,5% (v/v), 24 h a TA.
- 2) Sensibilización:** Se sensibilizaron placas de poliestireno de fondo plano de 96 pozos con las cantidades de mGMOP-IFN o mGMOP₃-IFN-mGMOP seleccionadas como niveles del DoE en 100 µL de solución de sensibilización. Se incubó 1 h a 37 °C y toda la noche a 4 °C.
- 3) Bloqueo:** El bloqueo de los sitios de interacción inespecífica se realizó con 200 µL por pozo de solución de bloqueo N°1, incubando 1 h a 37 °C.
- 4) Primera incubación:** Se añadieron 100 µL por pozo de los complejos antígeno-anticuerpo a los pozos sensibilizados y se incubó durante el tiempo especificado por el diseño experimental. Se incluyeron controles de máxima señal, negativos sin complejo y blancos de reactivos. La incubación se realizó durante 1 h a 37 °C.
- 5) Segunda incubación:** Se adicionaron 100 µL por pozo de anticuerpos de conejo anti-ratón conjugados con HRP, en las diluciones a evaluar preparadas en solución diluyente 1. Se incubó 1 h a 37 °C.
- 6) Revelado:** Se repitió el procedimiento detallado en la sección 6.1.3.
- 7) Cuantificación y análisis:** Las respuestas se modelaron utilizando el *software* Design-Expert 7.0, generando superficies de respuesta para identificar las condiciones óptimas de los factores evaluados.

El proceso de validación del ensayo se realizó mediante la obtención de: sensibilidad (SEN), límite de detección (LOD, *limit of detection*), límite de cuantificación (LOQ, *limit of quantification*) y rango lineal, siguiendo la Guía de Validación de Métodos Bioanalíticos para la Industria establecida por el ICH (*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*, (2022)).

A continuación, se describen las principales cifras de mérito:

- **Sensibilidad de la calibración:** es el cambio en la señal de la respuesta por unidad de cambio en la concentración del analito, es decir, la pendiente de la curva de calibración.

$$SEN = pendiente \quad (13)$$

- **LOD:** se define como la cantidad o concentración mínima de analito que puede ser detectada de manera confiable por un método analítico determinado.

$$LOD = 3,3 \times S_0 \quad (14)$$

S_0 es el desvío estándar (DS) de la concentración predicha para una muestra blanco.

- **LOQ:** es la concentración mínima cuantificable de forma confiable, definida como la concentración correspondiente a 10 veces el desvío estándar del blanco.

$$LOQ = 10 \times S_0 \quad (15)$$

Para estimar el valor de S_0 , se procedió de la siguiente manera:

$$S_{x_{inc}} = \frac{S_{fit}}{A} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(x_{inc} - \bar{x})^2}{\sum(x_i - \bar{x})^2}} \quad (16)$$

donde A es la pendiente de la recta de calibrado, n el número total de puntos, m el número de réplicas por punto, x_i el valor de cada nivel de la variable independiente y \bar{x} el promedio de las concentraciones de calibrado.

Cuando se analiza una muestra por triplicado ($m=3$), sin presencia del analito ($x_{inc}=0$), la ecuación (16) se reduce a:

$$S_0 = \frac{S_{fit}}{A} \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum(x_i - \bar{x})^2}} \quad (17)$$

- **Rango Lineal:** intervalo de concentraciones sobre el cual se ha demostrado la linealidad del método. Se considera que el rango lineal comprende desde la menor concentración que puede medirse (el LOQ) hasta la pérdida de la linealidad.

A su vez, se realizó el estudio de linealidad mediante la prueba F (p asociado $>0,05$) (Danzer y Curriet, 1998). La exactitud, definida como el grado de concordancia entre el valor verdadero y el obtenido por el método analítico validado, se evaluó comparando la respuesta de un estándar puro a 3 niveles de concentración (alto, medio y bajo, $n=3$) con la respuesta del analito, tanto en la misma solución de dilución como en una dilución 1:2 de sobrenadante de

cultivo condicionado por células sCHO no recombinantes. Se aplicó una prueba de región de confianza conjunta elíptica (EJCR) y un método de regresión de mínimos cuadrados bilineal (BLS). El método EJCR consiste en graficar la elipse de confianza conjunta para la pendiente y la intersección de la regresión lineal, verificando si el punto ideal (pendiente= 1, intersección= 0) está incluido en la elipse. Posteriormente, se realizó la prueba de no paralelismo (mediante regresión múltiple seguida de ANOVA) para comparar las pendientes de las curvas dosis-respuesta entre el estándar puro y el analito en la matriz diluida 1:2.

La precisión se evaluó en dos niveles: repetibilidad y precisión intermedia (diferentes días), analizando el coeficiente de variación (CV%) intraensayo e interensayo. El estándar interno se analizó en tres concentraciones dentro del rango lineal (baja, media y alta) en tres experimentos independientes.

7.3. Evaluación del mAb CC1H7 como herramienta de detección

El mAb CC1H7 reconoce específicamente el epítopo APARSPS presente en la molécula de hGM-CSF. Con el objetivo de evaluar este reconocimiento en el contexto de las proteínas de fusión mGMOP-IFN y mGMOP₃-IFN-mGMOP, se llevó a cabo un SDS-PAGE (sección 6.1.7) seguido de *western blot*. La electrotransferencia de las proteínas a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) se realizó empleando el sistema de electroforesis modular vertical Mini Protean 3 (transferencia sumergida). Se utilizó un protocolo estándar de transferencia de proteínas (Garfin, 1990), empleando una solución de transferencia fría, a intensidad de corriente constante de 180 mA durante 1 h, con refrigeración continua del dispositivo. Posteriormente, se llevó a cabo la detección inmunoquímica como se describe a continuación:

- 1) Bloqueo:** La membrana de PVDF se sumergió en solución de bloqueo N°3, incubándose toda la noche a 4 °C para bloquear los sitios sin proteínas adsorbidas.
- 2) Primera incubación:** La membrana se incubó con una solución de anticuerpo primario, ya sea el pAb de conejo anti-rhIFN- α 2b o el mAb CC1H7 anti-APARSPS, en una dilución 1:1000 en solución diluyente N°3 durante 1 h a TA con agitación.
- 3) Segunda incubación:** La membrana se incubó con el anticuerpo secundario conjugado a HRP según el anticuerpo primario empleado: Igs de cabra anti-Igs de conejo o Igs de conejo anti-Igs de ratón, en una dilución 1:2000 en solución diluyente N°3, durante 1 h a TA con agitación.
- 4) Revelado** Las bandas inmunorreactivas se visualizaron utilizando el kit de quimioluminiscencia PierceTM ECL *Western Blotting Substrate* (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las indicaciones del

fabricante. Para ello, se incubó la membrana con el reactivo durante 1 min a TA, 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 se expuso a una película fotográfica *Amersham Hyperfilm ECL* (GE Healthcare) en un cuarto oscuro durante 1-5 min. El revelado de la película fotográfica se efectuó en forma manual empleando el método convencional de revelado y fijación.

Luego de cada etapa, la membrana se lavó tres veces, sumergiéndola en solución de lavado durante 5 min en agitación a TA.

En el procedimiento de detección con el mAb CC1H7, se utilizó rhGM-CSF como control positivo, mientras que el rhIFN- α 2b no glicosilado (IFN-NG) se incluyó como control negativo o de especificidad. Por otro lado, en la detección con el pAb anti-rhIFN- α 2b, el IFN-NG se empleó como control positivo.

-
- **TBS:** Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5.
 - **Solución de bloqueo N°3:** Leche descremada 5,0% (p/v) en TBS.
 - **Diluyente N°3:** 0,5% (p/v) leche descremada en TBS-0,05% (v/v) Tween 20.
 - **Solución de lavado:** TBS- 0,05% (v/v) Tween 20.
 - **Solución de transferencia:** Tris/HCl 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% (v/v).

Para la evaluación del LOD de ambas variantes de rhIFN, se incubaron concentraciones desde 500 ng hasta 250 pg, incluyendo la solución de muestra como blanco. El LOD se determinó analizando las intensidades de señal cruda (*raw volume*) a partir de diluciones seriadas de ambas proteínas de fusión. Las señales se cuantificaron utilizando el *software* GelAnalyzer 23.1 y el ruido de fondo (RF) se calculó en base a los blancos. El LOD se definió como la concentración más baja de proteína en la que la señal superó la media del RF más 3,3 desviaciones estándar muestral.

$$LOD = \mu_{RF} + 3,3 DS \quad (18)$$

El LOQ se calculó de manera similar al LOD, analizando las intensidades de señal cruda de diluciones seriadas de ambas proteínas de fusión cuantificadas con el mismo *software*. El LOQ se definió como la concentración más baja de proteína en la que la señal superó la media del RF más 10 DS de la muestra.

$$LOQ = \mu_{RF} + 10 DS \quad (19)$$

8. OBTENCIÓN DE LOTES DE QUIMERAS DE rhIFN Y rhEPO

8.1. Purificación de las variantes de rhIFN y rhEPO mediante CIA empleando la matriz mAb CC1H7-*Sepharose*

Tanto las variantes de rhIFN como las de rhEPO fueron purificadas a partir de los sobrenadantes de cultivo obtenidos durante la producción en suspensión (sección 5.8.8) mediante CIA utilizando la matriz mAb CC1H7-*Sepharose* (sección 7.1.4), basada en la interacción específica entre el epítipo presente en las etiquetas de las proteínas de fusión y el mAb CC1H7.

8.2. Purificación de las variantes de rhIFN mediante CIA empleando la matriz mAb CA5E6-*Sepharose*

En paralelo con la optimización de la CIA basada en el mAb CC1H7 y para garantizar la disponibilidad de cantidades suficientes de las variantes de rhIFN y contar con un método de referencia para comparación, se empleó un protocolo alternativo de purificación. Este consistió en una CIA empleando la matriz mAb CA5E6-*Sepharose*, basada en la interacción específica entre el rhIFN y el mAb anti-rhIFN- α 2b CA5E6, que fue optimizada previamente en nuestro laboratorio y se describe a continuación.

Se prepararon 14 mL de matriz mediante acoplamiento del mAb CA5E6 purificado a la resina *Sepharose*TM 4B *Fast Flow* activada con CNBr, siguiendo el protocolo descrito en la sección 7.1.1. La capacidad teórica de unión se calculó empleando la ecuación (7), considerando que cada molécula de IgG (~150 KDa) puede unir al menos una molécula de IFN-NG (~19 KDa). La purificación de las variantes GMOP₃-IFN-GMOP y mGMOP₃-IFN-mGMOP a partir de los sobrenadantes de cultivo se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente protocolo:

- 1) Armado de la columna:** Se empaquetó un volumen de 6 mL de matriz de afinidad mAb CA5E6-*Sepharose* en una columna XK 16/20.
- 2) Equilibrado:** La matriz se equilibró con 5 VC de solución de equilibrado.
- 3) Acondicionamiento de muestra:** Se adicionó Tritón X-100 al sobrenadante de cultivo a una concentración final de 0,3% (v/v) y se ajustó el pH a 7,5. Luego se filtró con membranas de acetato de celulosa de 0,45 μ m en un sistema de vacío (Nalgene).
- 4) Siembra:** Se sembró 1 L de la muestra acondicionada. El FT se recolectó en un tubo cónico.
- 5) Lavado N°1:** Se lavó con 5 VC de la solución de lavado.
- 6) Lavado N°2:** Se lavó con 12 VC de la solución de lavado N°2.

- 7) Elución:** El rhIFN retenido se eluyó por descenso de pH, empleando 11 VC. Las fracciones se recolectaron sobre una solución de neutralización para lograr un pH neutro.
- 8) Conservación:** La matriz se lavó con 15 VC de solución de conservación y se almacenó a 4 °C.

Todas las etapas del proceso cromatográfico, se llevaron a cabo a un flujo de 1 mL.min⁻¹ (0,5 cm.min⁻¹). Las fracciones correspondientes a las distintas etapas se analizaron mediante ELISA sándwich para calcular los porcentajes de recuperación según la ecuación (12).

-
- **Equilibrado:** Tris/HCl 25 mM, Tritón X-100 0,3% (v/v), pH 7,5.
 - **Solución de lavado N°1:** Tris/HCl 25 mM, NaCl 0,5 M, Tritón X-100 0,2% (v/v), pH 7.
 - **Solución de lavado N°2:** NaCl 0,15 M.
 - **Elución:** Glicina 100 mM, pH 2.
 - **Solución de neutralización:** Tris 1 M a pH 8.
 - **Solución de conservación:** Etanol 20% (v/v), Fosfato de sodio 20 mM, pH 7.

8.3. Cuantificación de las variantes de rhIFN y rhEPO por ELISA

8.3.1. ELISA sándwich para rhIFN

Se utilizó un método de ELISA sándwich para la cuantificación de las variantes de rhIFN presentes en los sobrenadantes de cultivo y en las distintas fracciones de purificación (Ceaglio y col., 2008). Esta técnica se caracteriza por su alta sensibilidad y especificidad (elevada capacidad de detección), permitiendo además el reconocimiento de las distintas variantes de rhIFN analizadas. Se utiliza el mAb CA5E6 como anticuerpo de captura y un suero policlonal (pAb) de conejo como anticuerpo de detección obtenido a partir del IFN-NG producido en bacterias (Protech Pharma S.A) y empleando como inmunógeno. El protocolo utilizado se describe a continuación:

- 1) Sensibilización:** Se sensibilizaron placas de poliestireno de fondo plano de 96 pozos con 100 ng.pozo⁻¹ de mAb CA5E6 diluido en 100 µL de solución de sensibilización. Se incubó 1 h a 37 °C y toda la noche a 4 °C.
- 2) Bloqueo:** Los sitios de interacción inespecífica se bloquearon con 200 µL de solución de bloqueo N°2. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 3) Primera incubación:** Se agregaron 100 µL de diluciones sucesivas 1:2 del estándar IFN-NG desde 10 ng.mL⁻¹ a 0,078 ng.mL⁻¹. Las muestras se sembraron realizando diluciones seriadas al medio para poder compararlas con el estándar en el rango de linealidad de la curva. Las diluciones del estándar y de las muestras se prepararon en solución diluyente N°2. Se realizó un control negativo para evaluar

- la posible unión inespecífica de los reactivos, reemplazando el estándar con 100 μ L de solución diluyente. Se incubó 1 h a 37 °C.
- 4) Segunda incubación:** Se adicionaron 100 μ L por pozo de pAb de conejo anti-rhIFN diluido 1:1000 con solución diluyente N°2. Se incubó 1 h a 37 °C.
- 5) Tercera incubación:** Se agregaron 100 μ L por pozo de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado a HRP en una dilución 1:2000 en solución diluyente N°2. Se incubó 1 h a 37 °C.
- 6) Revelado:** Se repitió el procedimiento descrito en la sección 6.1.3.
- 7) Cuantificación:** Se graficaron los valores de absorbancia en función de las concentraciones del estándar IFN-NG y de las diluciones de las muestras en escala logarítmica. La concentración de las muestras se determinó utilizando el ensayo de rectas paralelas.

Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda. Después de cada etapa, se realizaron 6 lavados con solución de lavado.

8.3.2. ELISA sándwich para rhEPO

Para la cuantificación de las variantes de rhEPO en los sobrenadantes de cultivo y en las diferentes fracciones de purificación, se empleó un ensayo de ELISA sándwich, que emplea el mAb 2B2 como anticuerpo de captura y un pAb de conejo como anticuerpo de detección, ambos obtenidos utilizando rhEPO como inmunógeno. El protocolo empleado fue el siguiente:

- 1) Sensibilización:** Se sensibilizaron placas de poliestireno de fondo plano de 96 pozos con 100 ng.pozo⁻¹ de mAb 2B2 diluido en 100 μ L de solución de sensibilización. Se incubó 1 h a 37 °C y toda la noche a 4 °C.
- 2) Bloqueo:** Los sitios de interacción inespecífica se bloquearon con 200 μ L de solución de bloqueo N°2. Se incubó durante 1 h a 37 °C durante toda la noche.
- 3) Primera incubación:** Se agregaron 100 μ L de diluciones sucesivas 1:2 del estándar de rhEPO desde 2 μ g.mL⁻¹ a 0,015 μ g.mL⁻¹. Las muestras se sembraron realizando diluciones seriadas 1:2 para compararlas con el estándar en el rango de linealidad de la curva. Las diluciones del estándar y de las muestras se hicieron en solución diluyente N°2. Se realizó un control negativo para evaluar la posible unión inespecífica de los reactivos, reemplazando el estándar con 100 μ L de solución diluyente N°2. Se incubó 1 h a 37 °C.
- 4) Segunda incubación:** Se adicionaron 100 μ L por pozo de suero de conejo anti-rhEPO diluido 1:2000 con solución diluyente N°2. Se incubó 1 h a 37 °C.

- 5) Tercera incubación:** Se agregaron 100 μL por pozo de anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado a HRP en una dilución 1:2000 en solución diluyente N°2. Se incubó 1 h a 37 °C.
- 6) Revelado:** Se repitió el procedimiento detallado en la sección 6.1.3
- 7) Cuantificación:** Se graficaron los valores de absorbancia en función de las concentraciones del estándar de rhEPO y de las diluciones de las muestras en escala logarítmica. La concentración de las muestras se determinó utilizando el ensayo de rectas paralelas.

Para este ensayo también se realizaron las incubaciones en cámara húmeda y se realizaron 6 lavados con solución de lavado después de cada etapa.

8.3.3. ELISA sándwich para rhEPO modificado

Para cuantificar las variantes de rhEPO en las muestras de plasma de rata del ensayo farmacocinético *in vivo*, fue necesario utilizar un ensayo de ELISA sándwich optimizado (Wandel-Petersen y col., 2021), el cual mejora hasta 10 veces el LOD y el LOQ respecto a los parámetros del método previo, permitiendo detectar concentraciones considerablemente menores. Este protocolo se basa en el descrito en la sección 8.3.2, con las siguientes modificaciones específicas:

- **Sensibilización:** 500 ng.pozo⁻¹ del mAb 2B2
- **Curva estándar:** desde 400 ng.mL⁻¹ a 3,125 ng.mL⁻¹ de rhEPO
- **Detección:** dilución 1:250 del pAb de conejo anti-rhEPO
- **Conjugado:** dilución 1:1000 del anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a HRP

8.4. Concentración y diafiltración de las fracciones purificadas de rhIFN y rhEPO

Las fracciones correspondientes al pico de elución de cada proceso de purificación se mezclaron, concentraron y diafiltraron contra PBS utilizando un sistema de filtración por flujo tangencial (TFF) con columnas Pellicon 3 mini provistas con una membrana de ultrafiltración de 10 KDa. Posteriormente, se determinó su concentración (sección 8.5).

8.5. Determinación de la concentración de las variantes de rhIFN y rhEPO purificadas

La cuantificación de las variantes de rhIFN y rhEPO purificadas se llevó a cabo mediante espectrofotometría a $\lambda=280$ nm, como se describe en la sección 6.1.6, empleando la

ecuación (6). Para el cálculo de la concentración, se consideró el coeficiente de absorptividad para cada una de las variantes obtenido por el servidor web ExpASy ProtParam tool⁶:

- GMOP₃-IFN-GMOP: 1,574 mL.mg⁻¹.cm⁻¹
- mGMOP₃-IFN-mGMOP: 0,727 mL.mg⁻¹.cm⁻¹
- GMOP₃-EPO-GMOP: 1,789 mL.mg⁻¹.cm⁻¹
- mGMOP₃-EPO-mGMOP: 0,914 mL.mg⁻¹.cm⁻¹

8.6. Evaluación de la pureza de las proteínas

8.6.1. Análisis por SDS-PAGE

La masa molecular aparente y la pureza de las variantes de rhIFN y rhEPO purificadas se evaluaron mediante SDS-PAGE con posterior coloración con azul brillante de *Coomsie*, siguiendo el protocolo descrito en la sección 6.1.7.

8.6.2. Análisis cromatográfico

La pureza de las variantes de rhIFN y rhEPO purificadas por el sistema mGMOP-mAb CC1H7 fue analizada en Zelltek S.A mediante cromatografía de exclusión acoplada a cromatografía líquida de ultra alta performance (SEC-UHPLC). Esta técnica permite separar biomoléculas en función de su tamaño, sin depender de interacciones específicas con la fase estacionaria, resultando especialmente útil para la evaluación de la pureza de proteínas, ya que posibilita diferenciar la forma monomérica de posibles agregados o fragmentos. La combinación con UHPLC ofrece mayor resolución, rapidez y sensibilidad en comparación con la SEC convencional, lo que la convierte en una herramienta de referencia para el análisis de calidad de bioterapéuticos recombinantes. El análisis se realizó empleando una columna TSKgel G3000SWXL (tamaño de partícula de 5 µm, 7,8 mm de diámetro interno × 30 cm; Tosoh Bioscience LLC) en un sistema Shimadzu UHPLC HA-2003 a 25 °C. La columna se equilibró durante 60 min. Cada muestra fue inyectada con el mismo *buffer*. Los perfiles de elución se registraron a 280 nm con un caudal constante de 0,5 mL·min⁻¹.

-
- **Equilibrado:** NaCl 200 mM en fosfato de sodio 50 mM, pH 8,8.
 - **Elución:** NaCl 200 mM en fosfato de sodio 50 mM, pH 6,8.
 - **Conservante:** Etanol absoluto.

⁶ <https://web.expasy.org/protparam/>

9. CARACTERIZACIÓN DE LAS VARIANTES DE rhIFN Y rhEPO PURIFICADAS

9.1. Caracterización analítica y análisis de glicofomas

9.1.1. SDS-PAGE y *Western blot*

La calidad de las variantes de rhIFN y rhEPO, en términos de masa molecular y patrón de isoformas glicosiladas, fue evaluada mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y posterior detección por *western blot*, siguiendo el protocolo descrito en la sección 7.3. En el caso específico de las variantes de rhEPO, la detección con el mAb CC1H7 se comparó con la obtenida utilizando el pAb anti-rhEPO.

9.1.2. Isoelectroenfoque (IEF)

El análisis de las isoformas de las variantes de rhIFN y rhEPO se realizó por focalización isoelectrica, utilizando un sistema model 111 miniIEF cell (Bio-rad) con fuente de poder PowerPac 3000 (Bio-rad). Se prepararon geles de 0,5 mm de espesor, en una concentración de acrilamida/bisacrilamida del 5% (p/v) con el agregado de urea 5 M y sacarosa 10% (p/v). Para obtener el rango de pH deseado, se empleó un anfolito a 2% (p/v) con un rango de pH 3,5-5,5 (Bio-Lyte, Bio-rad). Las muestras se aplicaron a 1 cm del extremo superior y se absorbieron durante 10 min. La corrida se realizó en una cuba con electrodos de grafito humedecidos, empleando voltajes escalonados para evitar sobrecalentamientos: 15 min a 100 V, 15 min a 200 V y 90 min a 450 V. Finalizada la corrida, el gel se tiñó con azul brillante de *Coomasie* R-250 coloidal toda la noche a 37 °C y posteriormente se lavó repetidamente con agua destilada para retirar el exceso de colorante, preservándose hasta su escaneo.

-
- **Azul brillante de *Coomasie* coloidal:** *Coomasie* R-250 coloidal 0,025% (p/v) en metanol 20% (v/v), ácido acético 5% (v/v).
 - **Solución de preservación:** Ácido acético 7% (v/v).

9.1.3. Deglicosilación

La confirmación de la presencia de estructuras O-glicosídicas en las quimeras GMOP₃-IFN/EPO-GMOP y mGMOP₃-IFN/EPO-mGMOP fue llevada a cabo por medio de reacciones de deglicosilación enzimática secuencial. En particular, para las variantes de rhEPO, se realizó la liberación de oligosacáridos tipo N empleando la enzima PNGasa F (péptido-N⁴-(N-acetil-β-glucosaminil) asparagina amidasa), una amidohidrolasa de *Flavobacterium meningosepticum* que hidroliza el enlace glicosilamina, generando un residuo de Asp y liberando el oligosacárido correspondiente.

El protocolo llevado a cabo se detalla a continuación:

- 1) **N-deglicosilación:** Aplicado únicamente a las variantes de rhEPO. Se incubó 3 µg de proteína con 2 µL de solución desnaturizante 10X durante 10 min

a 100 °C. Se añadió una dilución 1:10 (v/v) de *Glycobuffer 2 10X*, 1:10 (v/v) de NP-40 10% y 15 UI de PNGasa F. La mezcla se incubó toda la noche a 37 °C.

2) Primera incubación:

Al día siguiente, a 500 ng del producto de la reacción anterior se le agregó una dilución 1:10 (v/v) de *Glycobuffer 1 10X* y 40 UI de α -2-3,6,8,9 Neuraminidasa A. A partir de este paso, se inició la O-deglicosilación de las variantes de rhIFN, de la misma manera que para rhEPO pero con 250 ng de proteína. En ambos casos, el volumen final se ajustó a 10 μ l con agua Milli-Q y se incubó 1 h a 37 °C.

3) Segunda incubación:

Una vez que las proteínas estuvieron libres de los ácidos siálicos terminales, se agregó una solución 1:10 (v/v) de BSA 100X, seguido de 1000 UI de 1,3- β -Galactosidasa al tubo de reacción proveniente de la primera incubación. Se incubó 1 h a 37 °C.

4) Tercera incubación:

Al tubo de reacción proveniente de la etapa anterior, se agregaron 1000 UI de β -N-Acetilhexosaminidasa. Se incubó 1 h a 37 °C.

5) Cuarta incubación:

Finalmente, se agregó al tubo de reacción una dilución 1:10 (v/v) de *Glycobuffer 2 10X* y 2000 UI de endo- α -N-Acetilgalactosaminidasa (*O-Glycosidase*), continuando la incubación toda la noche a 37 °C.

Para verificar la eliminación de los glicanos, las muestras resultantes de las reacciones fueron analizadas por SDS-PAGE siguiendo la metodología descrita en la sección 6.1.7.

9.1.4. Análisis del contenido de ácido siálico

Los ácidos siálicos forman una familia de derivados del ácido neuramínico, siendo el ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) y el ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) los más abundantes. Ocupan la posición terminal de los glicanos de muchas glicoproteínas de mamíferos y ejercen una gran influencia sobre sus propiedades. La cuantificación de Neu5Ac en las variantes de rhIFN purificadas se realizó mediante cromatografía de intercambio aniónico a pH elevado con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD), empleando el sistema DIONEX ICS-5000 (Dionex, Thermo Fisher Scientific) equipado con una columna CarboPac™ PA20 (Thermo Scientific Dionex) y una pre-columna AminoTrap™ (Dionex, Thermo Fisher Scientific). Este tipo de cromatografía se utiliza para separar analitos aniónicos o que pueden ionizarse en condiciones de pH elevado. La separación se produce en columnas compuestas por partículas de poliestireno divinilbenceno unidas electrostáticamente a microesferas que contienen grupos funcionales intercambiadores de aniones. Este método permite separar ambas especies de ácido siálico sin derivatización previa de la muestra.

Los ácidos siálicos fueron escindidos de las glicoproteínas mediante hidrólisis ácida suave en HCl 0,1 M mediante incubación a 80 °C durante 1 h. Las muestras se secaron en un concentrador de vacío (Savant SpeedVac, Thermo Fisher Scientific) y se resuspendieron en agua ultrapura. La cromatografía se realizó a 30 °C con un flujo de 0,5 mL.min⁻¹. Luego de la inyección automática de 100 µL de las muestras, se aplicó el gradiente descrito en la Tabla 2.

Tabla 2: Gradiente utilizado para el análisis de Neu5Ac

Tiempo (min)	% fase móvil A	% fase móvil B
0	90	10
4	90	10
14	50	50
17	50	50
18	10	90
25	10	90

Para la identificación y cuantificación de los picos se utilizó un estándar de Neu5Ac (Calbiochem) tratado igual que las muestras. La integración de los picos se realizó con el *software* Chromeleon v6.8.

- **Fase móvil A:** NaOH 100 mM.
- **Fase móvil B:** NaOAc 500 mM / NaOH 100 mM.

9.2. Caracterización conformacional de las proteínas

9.2.1. Dicroísmo Circular

Para determinar la estructura secundaria de las mutéínas de rhIFN y rhEPO en comparación con sus contrapartes nativas, se prepararon soluciones de 1 mg.mL⁻¹ de cada proteína y se utilizaron los servicios tecnológicos llevados a cabo en PLABEM (Plataforma Argentina de Biología Estructural y Metabólica, Rosario) para su análisis por dicroísmo circular. Las muestras fueron procesadas en un espectropolarímetro UV-Vis (JASCO J-1500) tanto en UV cercano como lejano. Para ello, se utilizó en el primer caso una cubeta de cuarzo de paso óptico de 10 mm, obteniéndose espectros de dicroísmo circular entre 250 y 320 nm, correspondiente a la región de absorción de aminoácidos aromáticos. En el caso del UV-lejano se utilizó una cubeta de cuarzo de 1 mm de paso óptico y se obtuvieron espectros entre 190 y 240 nm, correspondiente a la región de absorción de los enlaces que componen el plano peptídico.

9.2.2. Thermal Shift Assay

La temperatura de fusión de las proteínas se determinó mediante *Thermal Shift Assay*, empleando también los servicios tecnológicos desarrollados en PLABEM. Para ello, se prepararon soluciones 0,3 mg.mL⁻¹ de las variantes de rhIFN y rhEPO y sus análogos no modificados. El análisis consistió en el registro de la intensidad de emisión de fluorescencia de la sonda *Sypro Orange*, que se une selectivamente a regiones hidrofóbicas de la proteína, utilizando un termociclador en tiempo real. Las determinaciones se realizaron por triplicado, en un rango comprendido entre 20 y 90 °C. La temperatura de fusión se calculó mediante ajuste no lineal de los datos experimentales. Como control negativo se utilizó PBS.

9.3. Caracterización biológica

9.3.1. Actividad biológica *in vitro*

La utilización de bioensayos precisos y debidamente caracterizados resulta fundamental para el análisis de productos biológicos, constituyendo un elemento clave en su desarrollo como agentes 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 (Mire-Sluis, 2001; Mire-Sluis y col., 1995).

Los ensayos más utilizados para la medición de la actividad biológica de los rhIFNs 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. Además, el clonado de genes de respuesta a rhIFN ha permitido el desarrollo de "ensayos de gen reportero" (Meager, 2002).

Por su parte, la rhEPO ejerce su potencia biológica al estimular la proliferación y diferenciación de progenitores eritroides, lo que se traduce en un aumento de la producción de eritrocitos.

En resumen, la AB de cada proteína se determinó *in vitro* mediante ensayos de potencia basados en células, que miden la respuesta de las muestras en comparación con un estándar.

9.3.1.1. Actividad biológica antiviral (AAV) *in vitro* de rhIFN

Los ensayos de valoración biológica antiviral de los rhIFNs cuantifican la actividad inhibitoria que ejercen estas citoquinas sobre la propagación o replicación viral (Familletti y col., 1981). El procedimiento más simple y conveniente consiste en medir la capacidad del rhIFN para proteger a las células susceptibles del efecto citopático de un virus lítico para un rango de concentraciones de la citoquina. En el presente trabajo se utilizó el sistema línea celular MDBK/virus VSV, empleando un ensayo optimizado previamente en nuestro laboratorio (Ceaglio y col., 2010), y el estándar internacional de la OMS de rhIFN- α 2b producido en *E.*

coli obtenido del *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC 95/566), siguiendo la metodología que se detalla a continuación:

- 1) Plaqueo de células** La línea celular MDBK fue cultivada en medio de crecimiento hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial. En este punto, las células se cosecharon, se contaron y se resuspendieron en una densidad celular de $2,5 \times 10^5$ cél.mL⁻¹. Se sembraron 100 µL de esta suspensión celular en una placa de cultivo estéril de 96 pozos y se incubó durante 24 h a 37 °C.
- 2) Incubación con las proteínas de interés** Se eliminó el sobrenadante de cultivo por inversión, se escurrió y se lavó la placa con medio basal sin SFB. Se colocaron 100 µL por pozo de sucesivas diluciones 1:2 del NIBSC en medio de ensayo, desde una concentración de actividad de 20 UI.mL⁻¹ hasta 0,156 UI.mL⁻¹, incubándose durante 6 h a 37 °C. Las muestras se ensayaron en iguales condiciones, realizando una dilución inicial adecuada para compararlas con el estándar en el rango de linealidad de la curva.
- 3) Incubación con el virus** Finalizada la incubación, se eliminó el sobrenadante por inversión, se escurrió y se colocaron 100 µL de una dilución apropiada del virus VSV en medio de ensayo, incubándose durante 18 h hasta observar el máximo efecto citolítico en aquellos pozos correspondientes a las células no tratadas con rhIFN.
- 4) Revelado** Se eliminó el sobrenadante de cultivo por inversión, se escurrió y se adicionaron 50 µL por pozo de una solución de tinción. Se incubó durante 15 min a 37 °C. Aquellas células que no fueron lisadas por el virus y, por lo tanto, permanecieron adheridas al sustrato, fueron fijadas y coloreadas. 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 250 µL de ácido acético 20% (v/v). La lectura del color generado se efectuó a una $\lambda=540$ nm en el lector de placas de microtitulación que permite una homogeneización de la placa previo a la lectura.
- 5) Determinación de la AB** Se graficaron los datos de absorbancia en función de los valores de actividad del NIBSC (estándar) y de las diluciones de las muestras en escala logarítmica. Se calcularon los valores de AB para cada una de las nuevas moléculas mediante comparación con el NIBSC,

utilizando el método de rectas paralelas. Se determinó la actividad biológica específica (ABE) realizando el cociente entre la AB y la concentración de las variantes GMOP₃-IFN.GMOP y mGMOP₃-IFN-mGMOP.

En cada ensayo, el estándar de rhIFN- α 2b y las muestras se procesaron por triplicado, realizándose además dos tipos de controles:

- Control de crecimiento, en ausencia de rhIFN y de virus, para evaluar la máxima proliferación celular cuando no hay infección viral. Para ello, se reemplazaron los 100 μ L de la dilución del rhIFN y los 100 μ L de la dilución del virus por 200 μ L de medio de ensayo.
- Control de lisis, en ausencia de rhIFN, para evaluar el efecto del virus sobre las células. Para ello, se adicionaron 100 μ L de medio de ensayo en lugar de la dilución del rhIFN.

-
- **Medio de crecimiento MDBK:** MEM suplementado con SFB 10% (v/v).
 - **Medio de ensayo MDBK:** Medio MEM suplementado con de SFB 2% (v/v).
 - **Solución de tinción:** Cristal violeta 1% (p/v) en metanol 40% (v/v).

9.3.1.2. Actividad biológica antiproliferativa (AAP) *in vitro* de rhIFN

El ensayo de valoración de la actividad antiproliferativa *in vitro* del rhIFN- α 2b se basa en la cuantificación de los efectos que esta citoquina induce sobre la viabilidad y proliferación de la línea celular Daudi (Nederman y col., 1990). Se utilizó un método de revelado colorimétrico basado en la reducción del reactivo MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxi-fenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium)], en presencia de PMS [metasulfato de fenazina]. Este sistema refleja la proliferación celular, poniendo de manifiesto la presencia de enzimas deshidrogenasas que se encuentran en células metabólicamente activas y que catalizan la reducción del MTS en un cromógeno soluble (azul de formazán) que absorbe a 490 nm. El PMS actúa como dador de electrones. La cantidad de producto generado es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas en el cultivo. Se utilizó el estándar internacional de la OMS de rhIFN- α 2b producido en *E. coli* (NIBSC 95/566), siguiendo un protocolo optimizado previamente en el laboratorio, el cual se detalla a continuación:

- 1) Incubación con las proteínas** En placas estériles de fondo plano de 96 pozos se colocaron 50 μ L por pozo de sucesivas diluciones 1:2 del NIBSC de rhIFN- α 2b en medio de crecimiento, desde una concentración de actividad de 100 UI.mL⁻¹ hasta 0,78 UI.mL⁻¹. Las muestras se ensayaron en iguales condiciones, realizando una dilución inicial adecuada para compararlas con el estándar en el rango de linealidad de la curva.
- 2) Plaqueo de células** Las células Daudi fueron cultivadas en medio de crecimiento y cosechadas en fase exponencial, preparándose una suspensión

de 10^5 cél.mL⁻¹. Se adicionaron 50 μ L por pozo a la placa, incubándose durante 96 h a 37 °C.

3) Revelado

Se agregaron 20 μ L por pozo del reactivo de color preparado en el momento. La placa se incubó 5 h a 37 °C. La absorbancia del cromógeno se midió a una $\lambda=492$ nm contra lectura de fondo de placa a $\lambda=690$ nm para eliminar el ruido de fondo.

4) Determinación de la AB

Se graficaron los datos de absorbancia en función de los valores de actividad del NIBSC de rhIFN- α 2b y de las diluciones de las muestras en escala logarítmica. Se calcularon los valores de ABE para cada una de las nuevas moléculas de la misma forma que para AAV (sección 9.3.1.1).

El estándar de rhIFN- α 2b y las muestras se procesaron por triplicado, realizándose un control de crecimiento en ausencia de rhIFN para evaluar la máxima proliferación celular. Para ello, se agregaron 100 μ L de medio de crecimiento.

-
- **Medio de crecimiento:** RPMI suplementado con SFB 10% (v/v)
 - **Reactivo de color:** MTS 2 mg.mL⁻¹ y PMS 0,92 mg.mL⁻¹.

9.3.1.3. Actividad biológica eritropoyética *in vitro* de rhEPO

La actividad biológica eritropoyética *in vitro* de la rhEPO y de sus variantes se determinó mediante la cuantificación de los efectos que estas citoquinas inducen sobre la viabilidad y proliferación de las líneas celulares UT-7/EPO o TF-1, capaces de crecer en presencia de rhEPO. La viabilidad se evaluó con el método colorimétrico empleado en la determinación de la actividad antiproliferativa *in vitro* del rhIFN (Sección 9.3.1.2), siguiendo el siguiente protocolo:

- 1) Incubación con las proteínas** En placas estériles de fondo plano de 96 cavidades se colocaron 50 μ L por pozo de una referencia de rhEPO de actividad conocida que se empleó como estándar (Zelltek SA) en medio de ensayo específico para cada línea, realizando 8 diluciones sucesivas 1:2 desde 8,4 ng.mL⁻¹. Las muestras se ensayaron en iguales condiciones, realizando una dilución inicial adecuada para compararlas con el estándar en el rango de linealidad de la curva.
- 2) Preparación de células** Las líneas celulares fueron cultivadas en medio de crecimiento, cosechadas en fase exponencial, y centrifugadas durante 5 min a 200 x g. El sedimento celular se resuspendió en 30 mL de medio de lavado, centrifugándose nuevamente en las mismas condiciones. Este procedimiento se repitió 3 veces con el fin de eliminar el

- rhGM-CSF que sostiene el crecimiento de las células en cultivo. Posteriormente, las células se resuspendieron en medio de ensayo en una concentración de 2×10^5 cél.mL⁻¹ y se incubaron 3 h a 37 °C.
- 3) Plaqueo de las células** Se adicionaron 50 µL de suspensión celular (1×10^4 células por pozo), incubándose durante 72 h a 37 °C.
- 4) Revelado** Se agregaron 20 µL por pocillo del reactivo de color MTS/PMS, incubándose 4-5 h a 37 °C. La absorbancia del cromógeno se midió a una $\lambda=492$ nm contra lectura de fondo de placa a $\lambda=690$ nm.
- 5) Determinación de la AB** Se graficaron los datos de absorbancia en función de los valores de actividad de la rhEPO (estándar) y de las diluciones de las muestras en escala logarítmica. Los valores de AB se calcularon según lo descrito en la sección 9.3.1.1. La ABE se determinó realizando el cociente entre la AB y la concentración de las variantes GMOP₃-EPO-GMOP y mGMOP₃-EPO-mGMOP.

Las muestras y los controles se procesaron por triplicado. Se realizaron dos controles:

- Control de crecimiento: para evaluar la máxima proliferación celular en presencia de rhEPO. Para ello, se colocaron 50 µL de rhEPO 8,4 ng.mL⁻¹ en medio de ensayo.
- Control de muerte: para evaluar la proliferación celular en ausencia de rhEPO, para lo cual se colocaron 50 µL de medio de ensayo.

-
- **Medio de ensayo para UT-7/EPO:** IMDM con SFB 20% (v/v) y rhGM-CSF 5 ng.mL⁻¹.
 - **Medio de ensayo para TF-1:** RPMI con SFB 10% (v/v) y rhGM-CSF 2 ng.mL⁻¹.
 - **Medio de lavado:** Medio Basal correspondiente para cada línea.
 - **Medio de ensayo UT-7/EPO:** IMDM suplementado con SFB 20% (v/v).
 - **Medio de ensayo TF-1:** RPMI con SFB 10% (v/v).

9.3.2. Análisis de estabilidad

9.3.2.1. Estabilidad en plasma humano

Dado que uno de los principales mecanismos de eliminación tanto del rhIFN como de rhEPO es su inactivación por proteasas presentes en el plasma, se evaluó la estabilidad *in vitro* de las variantes en plasma humano. Para ello, las muestras de rhIFN o de rhEPO se diluyeron en plasma humano en una concentración de 1000 UI.mL⁻¹, en función de su actividad antiviral o eritropoyética, respectivamente. Posteriormente, se incubaron a 37 °C, tomando alícuotas a distintos tiempos: 0 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h y 168 h, las cuales se conservaron a -20 °C hasta su análisis. El porcentaje de actividad biológica residual se determinó mediante el ensayo de AAV (sección 9.3.1.1) para las variantes de rhIFN y el ensayo de actividad eritropoyética (sección 9.3.1.3) para las de rhEPO.

9.3.2.2. Estabilidad térmica

Con el objetivo de complementar el análisis de *thermal shift* y establecer una correlación entre la estructura y función de las variantes de rhIFN, se evaluó su actividad biológica residual tras la exposición a distintas temperaturas. Para ello, las muestras se diluyeron en PBS/BSA 0,1% (p/v) en una concentración de $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y se incubaron 10 min en un termociclador (Biometra) a distintas temperaturas: 20 °C (control), 25 °C, 37 °C, 45 °C, 55 °C, 65 °C, 75 °C, 85 °C y 95 °C, congelándose inmediatamente a -20 °C. Posteriormente, se evaluó la AAV residual (sección 9.3.1.1). La temperatura de *melting* (T_m), que indica la pérdida del 50% de actividad, se determinó a partir de los gráficos de porcentaje de actividad residual (%) en función de la temperatura (°C).

9.3.3. Farmacocinética

Con el propósito de evaluar la influencia de la porción glicosídica sobre los parámetros farmacocinéticos de las quimeras de rhIFN y rhEPO, así como identificar posibles diferencias entre los péptidos, se realizaron experimentos *in vivo* en animales de experimentación, los cuales fueron mantenidos en un bioterio a una temperatura controlada de 24 °C y un fotoperíodo luz/oscuridad de 12 h, proporcionándoles agua y comida *ad libitum*. Los estudios se llevaron a cabo empleando la vía de administración subcutánea para rhIFN y la vía intraperitoneal para rhEPO. El modelado de los datos se realizó mediante el *software* de modelado no lineal de efectos mixtos (NLME, del inglés *nonlinear mixed-effects model*) Monolix 2023R1 (Lixoft), empleando modelos monocompartimentales con cinética de absorción y eliminación de primer orden, con o sin compartimentos de tránsito (sección 9.3.3.3 y 9.3.3.4) según la proteína analizada.

9.3.3.1. Metodología experimental empleada para las variantes de rhIFN

Se emplearon ratas *Wistar* hembras provenientes del Centro de Medicina Comparada (CMC), ICiVet-Litoral (CONICET-UNL, Argentina), de dos meses de edad, con un peso promedio de 200 g. Las ratas fueron separadas en lotes de ocho animales cada uno e inyectadas por vía subcutánea con una dosis única de 2×10^5 UI totales de cada variante de rhIFN. Con el objetivo de minimizar los efectos negativos que podrían resultar de realizar numerosas extracciones de sangre y siguiendo las normas éticas que regulan el máximo volumen diario de sangre que puede extraerse, los animales de cada grupo fueron divididos en dos subgrupos de 4 ratas cada uno, los cuales fueron empleados para la extracción de sangre a tiempos alternados. Las muestras de sangre de los animales inoculados con las quimeras se tomaron a los siguientes tiempos postinyección: 5 y 30 min, 1, 3, 6, 9, 18, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 h; mientras que la extracción de sangre de los animales inoculados con el IFN-wt se realizó a los siguientes tiempos: 5 y 30 min, 1, 3, 6, 8, 10 y 24 h. Las muestras fueron centrifugadas

5 min a 3000 x g y el plasma fue separado y conservado a -20 °C para su posterior análisis. La cuantificación de las variantes en plasma se realizó mediante valoración de su AAV volumétrica (sección 9.3.1.1).

9.3.3.2. Metodología experimental empleada para las variantes de rhEPO

El análisis de las variantes de rhEPO se llevó a cabo en ratas *Wistar* hembras provistas por el bioterio del Instituto de Salud y Ambiente (ISAL, FCB UNL-CONICET), de dos meses de edad, con un peso promedio de 200 g. Las ratas fueron separadas en lotes de ocho animales cada uno e inyectadas por vía intraperitoneal con una dosis única de 100 µg de cada variante de rhEPO. Los animales de cada grupo fueron divididos en dos subgrupos de 4 ratas cada uno, los cuales fueron empleados para la extracción de sangre a tiempos alternados. Las muestras de sangre de los animales inoculados con las quimeras se tomaron a los siguientes tiempos postinyección: 30 min, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 h; mientras que la extracción de sangre de los animales inoculados con la rhEPO se realizó a los siguientes tiempos 30 min, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 24 y 48 h. Las muestras fueron centrifugadas 5 min a 3000 x g y el plasma fue separado y conservado a -20 °C para su posterior análisis. La cuantificación de las variantes en plasma se realizó mediante ELISA sándwich (sección 8.3.3).

9.3.3.3. Modelo de un compartimento con cinética de absorción y eliminación de primer orden

Este tipo de modelo se ajusta de manera adecuada al comportamiento de fármacos administrados en solución acuosa por vía oral, intramuscular o subcutánea. El 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. Además, el modelo describe la distribución del fármaco en un único compartimento principal compuesto de tejidos corporales cinéticamente indistinguibles y su eliminación a partir del mismo. En el caso de una droga administrada en forma oral, la tasa de cambio en la cantidad de fármaco en el cuerpo en un momento dado depende de las velocidades relativas de absorción y eliminación del fármaco. Esto se ilustra en la Fig. 12, donde D_{GI} es la cantidad de fármaco en el tracto gastrointestinal, D_E es la cantidad de fármaco eliminado, D_B es la cantidad de fármaco en el cuerpo, V_D es el volumen aparente de distribución, k_a es la constante de velocidad de absorción de primer orden y k_e es la constante de eliminación de primer orden.

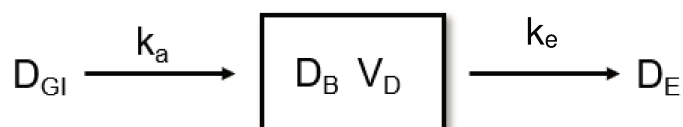


Figura 12: Modelo de un compartimento con absorción y eliminación de primer orden.

La velocidad de desaparición de la droga en el tracto gastrointestinal (GI), que en valor absoluto representa la velocidad de absorción por el organismo, se describe como:

$$\frac{dD_{GI}}{dt} = -FD_{GI}k_a \quad (20)$$

donde F es la fracción de fármaco absorbida. La velocidad de eliminación de la droga del organismo se puede expresar como $-k_e D_B$. 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:

$$\frac{dD_B}{dt} = Fk_a D_{GI} - k_e D_B \quad (21)$$

Integrando la ecuación anterior 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:

$$C_p = \frac{Fk_a D_0}{V_D(k_a - k_e)} (e^{-k_e t} - e^{-k_a t}) \quad (22)$$

En la Fig. 13 se muestra un perfil típico de la concentración de una droga en el cuerpo luego de una única dosis extravascular.

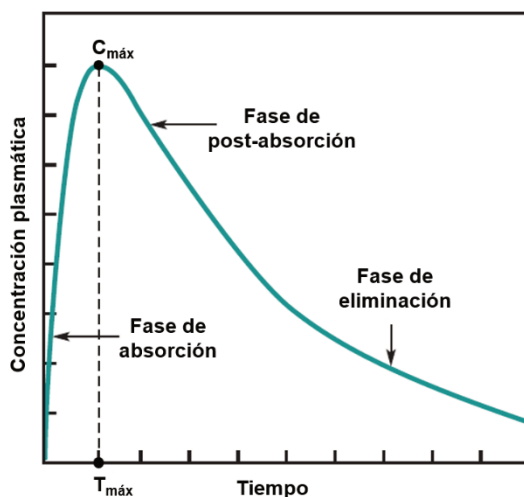


Figura 13: Perfil plasmático de una droga inyectada por vía extravascular. Se indican las fases de absorción y de eliminación de la misma. Figura adaptada de Shargel y Yu (2016).

La máxima concentración plasmática luego de la administración se denomina $C_{máx}$ y el tiempo necesario para alcanzar dicha concentración, $T_{máx}$, el cual es independiente de la dosis y depende de k_a y de k_e . Cuando se produce la $C_{máx}$, 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. La tasa de cambio de la concentración de la droga a $C_{m\acute{a}x}$ puede obtenerse diferenciando la ecuación 22.

$$\frac{dC_p}{dt} = \frac{Fk_aD_0}{V_D(k_a - k_e)} (K_e e^{-k_e t} - K_a e^{-k_a t}) \quad (23)$$

La cual puede simplificarse como:

$$k_e e^{-k_e t} = k_a e^{-k_a t} \quad (24)$$

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

$$T_{m\acute{a}x} = \frac{2,3 \log (k_a/k_e)}{k_a - k_e} \quad (25)$$

El tiempo de vida media de eliminación ($t_{\frac{1}{2}elim}$) se puede obtener a partir de la siguiente expresión:

$$t_{\frac{1}{2}elim} = \frac{0,693}{k_e} \quad (26)$$

Este parámetro hace referencia al tiempo transcurrido hasta que la concentración plasmática de la droga se reduce a la mitad.

Otro parámetro importante que describe el comportamiento de un fármaco en un sistema es su velocidad de eliminación del organismo o *clearance*. El *clearance* es un término farmacocinético que describe la eliminación de fármacos sin identificar el mecanismo específico del proceso; considera al organismo como un único sistema de eliminación en el que pueden intervenir múltiples procesos de eliminación no identificados. El *clearance* considera que la droga se encuentra uniformemente distribuida en un volumen de fluido (volumen aparente de distribución, V_D), a partir del cual la concentración de la droga puede medirse fácilmente. Típicamente, el *clearance* se define como el volumen fijo de líquido (que contiene el fármaco) eliminado del organismo por unidad de tiempo. Alternativamente, el *clearance* puede definirse como la velocidad de eliminación de una droga dividida por su concentración en plasma.

$$Cl = \frac{dD_E}{dt} \cdot C_p \quad (27)$$

Reordenando la ecuación anterior se tiene:

$$\text{Velocidad de eliminación} = \frac{dD_E}{dt} = C_p \cdot Cl \quad (28)$$

Para drogas que siguen una cinética de eliminación de primer orden, la velocidad de eliminación depende de la cantidad de droga remanente en el cuerpo.

$$\frac{dD_E}{dt} = k \cdot D_B = k \cdot C_p \cdot V_D \quad (29)$$

Sustituyendo la velocidad de eliminación de la ecuación 28 por $k \cdot C_p \cdot V_D$ de la ecuación 29 y reordenando, se obtiene:

$$Cl = \frac{k \cdot C_p \cdot V_D}{C_p} = k \cdot V_D \quad (30)$$

La ecuación anterior muestra que el *clearance* es el producto entre dos constantes, V_D y k . El volumen aparente de distribución (V_D) no representa un volumen fisiológico real. Algunas drogas tienen un volumen de distribución menor o igual a la masa corporal, mientras que otras pueden presentar un V_D varias veces superior a la misma. Las drogas con un V_D grande se encuentran concentradas predominantemente en tejidos extravasculares. Por el contrario, si la droga se encuentra fuertemente unida a proteínas plasmáticas o permanece en el compartimento vascular, su concentración en plasma será mayor, resultando en un menor volumen aparente de distribución.

9.3.3.4. Modelo de un compartimento con compartimentos de tránsito y cinética de absorción y eliminación de primer orden

Luego de la administración extravascular de un fármaco, transcurre un tiempo antes de que aparezca en la circulación sistémica. Este tiempo refleja procesos como:

- (i) Desintegración del sistema de administración
- (ii) Disolución y/o liberación del fármaco,
- (iii) Tránsito hacia el sitio de absorción,
- (iv) Migración del fármaco hacia la superficie de absorción y/o
- (v) Transferencia a través del tejido desde el sitio de absorción.

Debido a esto, la aparición del fármaco en la circulación se retrasa, fenómeno conocido como retraso de absorción (*absorption delay*). Aunque se trata de un fenómeno complejo, el enfoque estándar en farmacocinética es bastante simple: se introduce un parámetro de tiempo de retraso (*lag time, t_{lag}*), que pospone el momento de la dosificación como si el medicamento se hubiera administrado en un momento posterior. Esto ayuda a describir los perfiles de absorción retardada con mayor precisión; sin embargo, en algunos casos, estos modelos pueden fallar en describir adecuadamente esta fase. Para mejorar la descripción fisiológica y el impacto de la formulación y propiedades fisicoquímicas del fármaco, se modela la absorción como un proceso de múltiples pasos.

Se han desarrollado modelos farmacocinéticos basados en la fisiología que tienen en cuenta las propiedades fisicoquímicas del fármaco, como la velocidad de disolución o la dependencia del pH en la solubilidad, así como procesos fisiológicos complejos de absorción, metabolismo intestinal y hepático, y tránsito hacia la superficie de absorción. Estos modelos mecanicistas requieren un amplio conocimiento previo, incluyendo el área de superficie de absorción, la concentración del fármaco en el lumen, la abundancia de enzimas gastrointestinales y hepáticas, etc., información que no siempre está disponible, dificultando su aplicación rutinaria.

Los modelos de absorción basados en compartimentos de tránsito satisfacen esta limitación, al describir la absorción del fármaco como un proceso de múltiples pasos representado por una cadena de compartimentos presistémicos, sin asignar un correlato físico a cada compartimento (Fig. 14).

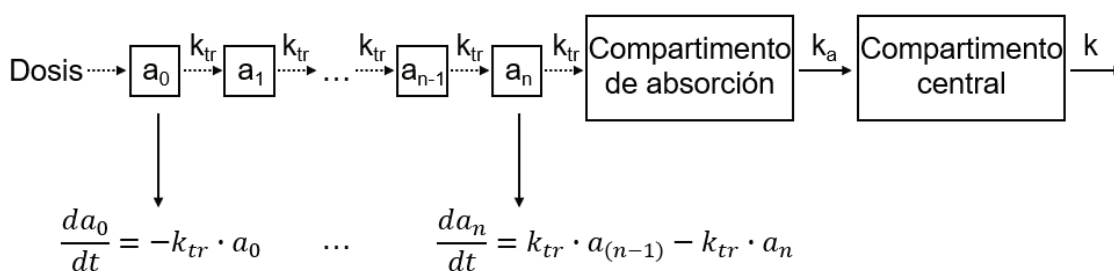


Figura 14: Perfil plasmático de una droga absorbida mediante compartimentos de tránsito.

Este modelo describe el retraso de la absorción por el paso del fármaco a través de estos compartimentos con una única constante de velocidad de transferencia, k_{tr} . La tasa de cambio de la cantidad de fármaco en el compartimento n está dada por:

$$\frac{da_n}{dt} = k_{tr} \cdot a_{n-1} - k_{tr} \cdot a_n \tag{31}$$

donde, $\frac{da_n}{dt}$ representa la tasa de cambio de la sustancia a en el compartimento n en el tiempo t , a_n es la cantidad de fármaco en el compartimento n en el tiempo t , k_{tr} representa una constante de velocidad de tránsito desde el compartimento $n - 1$ al compartimento n y n es el número de compartimentos de tránsito. La solución analítica para a_n viene dada por la función:

$$a_n = F \cdot D_0 \cdot \frac{(k_{tr} \cdot t)^n}{n!} \cdot e^{-k_{tr} \cdot t} \quad (32)$$

Donde $n!$ es la función factorial de n . Para computar numéricamente esta función, se utiliza la aproximación de Stirling:

$$n! \approx \sqrt{2\pi} \cdot n^{n+0.5} \cdot e^{-k_{tr} \cdot t} \quad (33)$$

De esta manera, el fármaco es transferido desde el último compartimento de tránsito al compartimento central a través de un compartimento de absorción en el cual la desaparición de la droga se describe a través de la constante de velocidad k_a . La tasa de cambio de la concentración del fármaco en el compartimento de absorción ($\frac{dA_a}{dt}$) está dado por:

$$\frac{dA_a}{dt} = F \cdot D_0 \cdot k_{tr} \cdot \frac{(k_{tr} \cdot t)^n \cdot e^{-k_{tr} \cdot t}}{\sqrt{2\pi} \cdot n^{n+0.5} \cdot e^{-n}} - k_a \cdot A_a \quad (34)$$

Dada la complejidad matemática de la ecuación diferencial anterior, la solución a la misma es aproximada por un *software* mediante un método de integración numérica (por ej., el método BDF, *backward differentiation formula*), y, por lo tanto, no se cuenta con una expresión matemática para A_a .

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:

$$\frac{dD_B}{dt} = k_a \cdot A_a - k \cdot D_B \quad (35)$$

De forma similar a la ecuación 34, la solución a la ecuación 35 es aproximada por un *software* mediante un método de integración numérica.

Debido a la falta de una solución analítica que describa la concentración del fármaco en plasma, la estimación de $C_{m\acute{a}x}$ y $T_{m\acute{a}x}$, se llevó a cabo mediante un método de aproximación numérica. Para ello, se calcularon múltiples valores de concentración en plasma en intervalos

de tiempo muy pequeños (dt), centrados en el rango cercano al valor máximo observado en la gráfica de concentración en función del tiempo. Este enfoque permitió identificar el punto máximo con mayor precisión al evaluar la curva en intervalos muy finos alrededor del máximo estimado. El $t_{\frac{1}{2}elim}$ y el Cl se calcularon con las ecuaciones 26 y 30, respectivamente.

Un parámetro útil en el modelo con compartimentos de tránsito es el tiempo medio de tránsito (MTT), que representa el tiempo promedio que tardan las moléculas del fármaco en viajar desde el primer compartimento de tránsito hasta el compartimento de absorción. La relación entre MTT , n y k_{tr} se muestra en la siguiente ecuación:

$$k_{tr} = \frac{n + 1}{MTT} \quad (36)$$

9.3.3.5. Estimación de los parámetros poblacionales, individuales y evaluación de la calidad de los modelos

Para la estimación de los parámetros poblacionales se utilizó el estimador de máxima verosimilitud de los parámetros de la población, sin aproximaciones al modelo (sin linealización) utilizando el algoritmo *Stochastic Approximation Expectation Maximization* (SAEM). Los errores estándar se calcularon mediante la estimación de la Matriz de Información de Fisher (FIM) mediante aproximación estocástica. La media condicional de los parámetros individuales se calculó mediante un muestreo de la distribución condicional utilizando un procedimiento de Montecarlo basado en cadenas de Markov (MCMC). Se utilizaron los ajustes individuales, los gráficos de observaciones *versus* predicciones, la verosimilitud logarítmica, el criterio de información de Akaike (AIC), el criterio de información bayesiano (BIC) y el criterio de información bayesiano corregido (BICc) para evaluar la calidad de los diferentes modelos obtenidos.

9.4. Actividad antitumoral *in vivo* de rhIFN

La capacidad antiproliferativa de las variantes de rhIFN fue evaluada en ratones *nude* atímicos de la cepa N:NIH nu/nu de 8 a 10 semanas de edad (Laboratorio de animales de experimentación, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata). Esta cepa surgió en Glasgow, Escocia, en el año 1962, por una mutación en una colonia exocriada de ratones albinos Swiss. La mutación involucra un gen autosómico y recesivo asociado a la ausencia de pelo que produce una disgenesia gonadal, aumento de la susceptibilidad a infecciones y a variaciones de temperatura. El ratón homocigota recesivo (nu/nu) presenta aplasia de timo, la cual produce numerosos defectos del sistema inmunológico y, por ende, una escasa respuesta a los antígenos timodependientes, debido a deficiencias cuantitativas y funcionales de las células T. Por estas características, es una de la cepa más utilizadas en

investigación biomédica en el campo de la oncología, ya que estos animales son capaces de aceptar trasplantes tumorales sin producir el rechazo de los mismos (Jungersen y Piedrahita, 2018). Por su condición de inmunodeficientes, los ratones *nude* deben obligatoriamente mantenerse bajo estrictas condiciones ambientales, libres de virus, bacterias, parásitos y hongos, por lo cual se los califica de acuerdo con su condición sanitaria como animales libres de patógenos específicos (SPF, *specific pathogen free*) (Carbone y Maschi, 2006). Por este motivo, los mismos se alojaron en un bioterio dentro de un gabinete de flujo laminar tipo I provisto de un filtro HEPA, a una temperatura de (28 ± 1) °C y un fotoperíodo luz/oscuridad de 14-10 h. Se mantuvieron en cajas de acero inoxidable con lecho de viruta-marlo estéril y se les proporcionó agua corriente autoclavada y alimento irradiado con luz UV *ad libitum*. Para su manipulación, se utilizó guardapolvo, guantes, cofia y barbijo, con el fin de evitar la transmisión de agentes infecciosos.

La actividad antitumoral de las variantes de rhIFN se evaluó mediante su habilidad para reducir el crecimiento de tumores sólidos implantados subcutáneamente en los ratones *nude*. Para ello, se empleó la línea tumoral prostática humana PC-3, las cuales se cultivaron en medio RPMI con 10% (v/v) de SFB. Las células se cosecharon a partir de cultivos subconfluentes mediante tratamiento con tripsina, se lavaron con medio RPMI libre de suero, se contaron y se resuspendieron en una densidad celular de 1×10^7 cél.mL⁻¹ en PBS. Los ratones fueron inyectados por vía subcutánea en el flanco trasero izquierdo con 200 µl de la suspensión celular (2×10^6 células por animal). Dos días después, se dividieron al azar en 4 grupos de 6-7 animales cada uno para el comienzo del tratamiento. Tres de estos grupos recibieron una inyección semanal subcutánea peritumoral de 5 µg de cada una de las proteínas (IFN-wt, GMOP₃-IFN-GMOP y mGMOP₃-IFN-mGMOP). El grupo restante recibió inyecciones de PBS estéril, que constituye el vehículo con el cual se realizaron las diluciones de las moléculas.

La medición de las dimensiones de los tumores se llevó a cabo semanalmente previo al tratamiento utilizando un calibre. El cálculo del volumen tumoral se realizó asumiendo una geometría elíptica, debido a que se ha encontrado que la fórmula del elipsoide permite correlacionar adecuadamente el volumen con la masa del tumor (Stribbling y Ryan, 2022). De acuerdo con ello, se utilizó la siguiente ecuación:

$$V = \frac{1}{2} \times M \times W^2 \quad (37)$$

donde *M* es el eje mayor y *W* el eje menor del tumor.

Para cada grupo, se graficó el volumen del tumor en función del tiempo desde el inicio del tratamiento. La velocidad de crecimiento tumoral bajo las diferentes terapias se calculó como la pendiente de la curva de cada animal y se expresó como el valor promedio \pm DS. Luego de

5 semanas de tratamiento, los ratones fueron sacrificados y los tumores fueron extraídos y pesados. Los resultados entre grupos se compararon con test t de *Student* o ANOVA, según correspondiese, considerando la existencia de diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

La velocidad de crecimiento se estimó como el incremento de volumen tumoral entre el tiempo inicial y final del ensayo, dividido por el intervalo de tiempo correspondiente. Las curvas de crecimiento se ajustaron a la ecuación del modelo exponencial, a partir de la cual se determinó la tasa específica de crecimiento. El tiempo de duplicación se calculó empleando la relación:

$$\textit{Tiempo de Duplicación} = \frac{\ln(2)}{\textit{tasa de crecimiento}} \quad (38)$$

9.5. Actividad eritropoyética *in vivo* de rhEPO

Para evaluar la potencia *in vivo* de las quimeras de rhEPO, se analizó su capacidad para estimular la producción de reticulocitos en ratones normocitéricos BALB/cCmedc de 8 semanas de edad, siguiendo la metodología descrita en la *European Pharmacopoeia 12.0* (2025). para soluciones de eritropoyetina concentrada. Los ensayos se realizaron en el CMC, ICiVet-Litoral. Brevemente, tanto las muestras como el estándar se prepararon en una concentración supuesta de $1000 \text{ UI}\cdot\text{mL}^{-1}$ en 0,01 M de PBS, pH 7,2 estéril y se administraron 0,5 mL en grupos de 8 animales distribuidos aleatoriamente. Los ratones fueron sacrificados entre las 90 y 100 h posteriores al inicio del tratamiento, recolectándose las muestras de sangre en un intervalo máximo de 3 h, las cuales fueron teñidas con naranja de tiazol y analizadas mediante citometría de flujo (Attune NxT) para determinar el porcentaje de reticulocitos. La potencia biológica se calculó aplicando el método estadístico de comparación de líneas paralelas.

RESULTADOS

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de esta tesis se agruparon en secciones de acuerdo con los tres objetivos específicos planteados.

En primer lugar, se aborda la utilidad de las etiquetas como herramientas para el desarrollo de procedimientos de purificación, detección y cuantificación basados en la interacción mGMOP-mAb CC1H7: CIA, *western blot* y ELISA de competición, empleando como proteína modelo al hIFN fusionado a una o cuatro copias de la etiqueta mGMOP.

La segunda sección se enfoca en el estudio de la capacidad de las etiquetas (GMOP y mGMOP) para aportar sitios potenciales de O-glicosilación que contribuyan a mejorar la estabilidad y las propiedades farmacocinéticas de las proteínas de fusión. Para ello, se trabajó en condiciones de hiper-O-glicosilación, utilizando como modelo al hIFN fusionado a cuatro copias de cada una de las etiquetas. En este punto, se busca determinar si, en el contexto de hiper-O-glicosilación generado por el número de etiquetas fusionadas, existen diferencias en las propiedades farmacocinéticas de ambas proteínas, considerando el mayor grado de O-glicosilación conferido por mGMOP en comparación con GMOP. Asimismo, se evaluará si el péptido mGMOP confiere una mayor disminución de la actividad biológica *in vitro* de la proteína que lo contiene con respecto a aquella que se exprese junto al péptido GMOP. Este análisis permitirá comparar la influencia sobre la actividad biológica *in vivo* de las propiedades farmacocinéticas con relación a la capacidad de interacción con el receptor de las proteínas hiper-O-glicosiladas. Finalmente, se describe la validación de la bifuncionalidad de ambas etiquetas mediante su aplicación a una segunda proteína terapéutica, la hEPO, integrando tanto las potenciales ventajas funcionales como operativas del sistema, y verificando si se mantienen las tendencias observadas en cuanto a las propiedades farmacocinéticas y la actividad biológica.

1. EVALUACIÓN DEL SISTEMA DE AFINIDAD mGMOP-mAb CC1H7

Para el desarrollo y validación de metodologías analíticas y de purificación basadas en la interacción mGMOP-mAb CC1H7, se utilizaron dos variantes del hIFN:

- hIFN fusionado a una copia del péptido: mGMOP-IFN
- hIFN fusionado a cuatro copias del péptido: mGMOP₃-IFN-mGMOP

La variante con una única copia fue diseñada y producida previamente en el laboratorio (Sales y col., 2021), mientras que la construcción y expresión de la variante con múltiples copias fue llevada a cabo en el presente trabajo, como se describe en la sección 2.1 de Resultados y Discusión (RyD).

Por otra parte, el mAb CC1H7 fue obtenido a partir de cultivos de hibridomas, como se detalla a continuación (sección 1.1).

1.1. Obtención del mAb CC1H7

1.1.1. Adaptación a suspensión y análisis de productividad

El proceso de adaptación del hibridoma productor del mAb CC1H7 a SFM y en agitación, se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en la sección 6.1.1 de Materiales y Métodos (MyM). Para ello, se descongeló un criotubo del hibridoma en medio DMEM suplementado con 20% (v/v) de SFB en condiciones estáticas. Dado que este clon permaneció criopreservado por un período prolongado, se empleó por única vez una capa de células alimentadoras con el fin de favorecer su recuperación, crecimiento y proliferación.

Una vez que el cultivo mantuvo su viabilidad por encima del 90% y demostró un crecimiento sostenido, se inició la primera etapa de adaptación mediante la reducción gradual de la concentración del SFB hasta 1,25% (v/v). Durante los cultivos intermedios la viabilidad también se mantuvo constante por encima del 90%, pero en esta última condición se registraron valores levemente menores. Esto podría deberse a la pérdida de adherencia de los hibridomas, lo que, en ausencia de agitación, favoreció la formación de agregados celulares que pueden limitar el intercambio gaseoso y dificultar el acceso a nutrientes, comprometiendo así la viabilidad. Por este motivo, no fue posible reducir el contenido de suero a 0,6 % (v/v), ya que los hibridomas no lograron proliferar.

Al alcanzar una concentración de SFB de 1,25% (v/v), se reemplazó el medio con suero por una mezcla libre de suero (50% DMEM – 50% EX-CELL 620) y se trasladó el cultivo a agitación hasta su adaptación. Este cambio se realizó en forma directa, ya que se ha reportado que una adaptación secuencial puede provocar una marcada disminución de la productividad del mAb. La aparición de subpoblaciones poco productoras durante cultivos prolongados de hibridomas en condiciones con bajo o nulo contenido de SFB ha sido documentada previamente (Frame y Hut, 1990; Lee y col., 1989; Merritt y Palsson, 1993).

Dado que los hibridomas son genéticamente inestables, el estrés generado por la adaptación podría afectar la expresión del mAb no solo en la cantidad producida sino también en su calidad. Por este motivo, se verificó su capacidad de reconocimiento antigénico mediante determinación del título de anticuerpos por ELISA específico indirecto (sección 6.1.3). El título de corte se definió como la mayor dilución del sobrenadante cuya absorbancia superó en 3 desvíos estándar al promedio del control negativo. Los valores obtenidos se contrastaron con los previamente registrados en el laboratorio y obtenidos a partir de la producción del mAb en líquido ascítico (Tabla 3).

Tabla 3: Título y concentración efectiva del mAb CC1H7 en ascitis y en cultivo en su condición inicial y tras la adaptación

mAb CC1H7	Título	CE50 (µg/ml)
Ascitis	1:1×10⁷	(11 ± 7)×10⁻³
DMEM + 20 % SFB (v/v)	1:1,6×10⁴	(12 ± 1)×10⁻³
50%DMEM + 50% EX-CELL	1:2,6×10⁴	(10 ± 7)×10⁻³

Como se esperaba, el líquido ascítico presentó el título más alto de anticuerpos, con una concentración de 11 mg.mL⁻¹, lo cual concuerda con los valores reportados para esta metodología (5-20 mg.mL⁻¹) (Randerson, 1985). Al pasar de un sistema *in vivo* a uno *in vitro*, los títulos disminuyeron notablemente, aunque la condición sin suero mostró un título superior al medio con suero. La funcionalidad del mAb se mantuvo, ya que los valores de CE50 fueron similares para la ascitis y los cultivos *in vitro*, sin diferencias estadísticamente significativas, lo que indica una conservación del reconocimiento antigénico y de la afinidad aparente tras la adaptación. Las productividades se registraron a lo largo del proceso de adaptación, proporcionando información útil para futuras optimizaciones. Se observó un incremento progresivo de la productividad a medida que disminuyó el contenido de suero, alcanzándose valores más altos en la condición final sin suero y en agitación, en comparación con la condición inicial en la que se utilizó 20% (v/v) de SFB (Fig. 15). Si bien no se detectaron diferencias significativas al analizar las condiciones como grupos independientes mediante ANOVA-Welch, el análisis de regresión considerando la concentración de SFB como variable continua evidenció una relación negativa significativa entre ambas variables ($p < 0,001$), indicando que la productividad aumenta significativamente a medida que disminuye la concentración de suero. En conjunto, estos resultados confirman una adaptación exitosa del hibridoma a condiciones sin suero y en suspensión, que evitan el uso de animales y proporcionan ventajas como mayor reproducibilidad y escalabilidad, reducción de costos, eliminación de interferencias o potenciales patógenos derivados del uso de SFB, permitiendo optimizar el proceso de manera controlada.

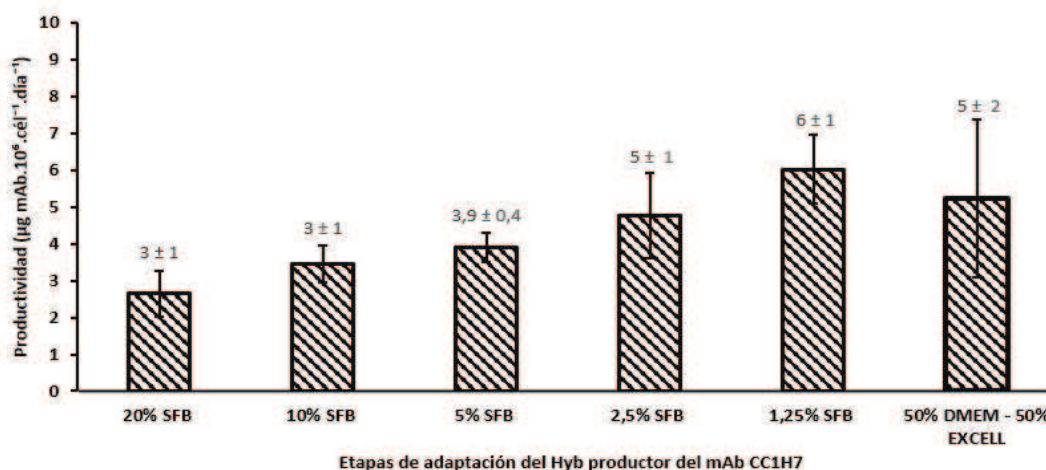


Figura 15: Productividad del hibridoma productor del mAb CC1H7 en cada una de las etapas de adaptación.

1.1.2. Producción *in vitro* del mAb CC1H7 en las condiciones de adaptación

Con el propósito de disponer de una cantidad suficiente de anticuerpo para su posterior empleo como reactivo en técnicas analíticas y en la preparación de matrices de IAF destinadas a la purificación de proteínas fusionadas a los péptidos GMOP o mGMOP, se realizó la producción del mAb CC1H7 en modo *batch* asegurando que el cultivo mantuviera una viabilidad igual o superior al 90% durante el proceso. Se realizaron varios ciclos de cosecha hasta obtener una masa total de 164 mg de mAb.

1.1.3. Purificación del mAb CC1H7 por cromatografía de afinidad a proteína A

El mAb CC1H7 se purificó a partir de los sobrenadantes de cultivo previamente acondicionados, centrifugados y filtrados, empleando cromatografía de afinidad a proteína A. Se llevaron a cabo varios ciclos, los cuales fueron monitoreados por espectrofotometría a $\lambda=280$ nm. En la Fig. 16 se muestra un cromatograma representativo.

En los distintos procedimientos realizados se obtuvieron recuperaciones entre 90 y 100%. Las fracciones correspondientes a cada pico de elución se reunieron en un único *pool*, cuya concentración de Igs murinas se determinó mediante medición espectrofotométrica a $\lambda=280$ nm, empleando la ecuación (6) de la sección 6.1.6 de MyM. La pureza del mAb, evaluada por SDS-PAGE, fue superior al 95%, lo que se consideró adecuado para su utilización como herramienta analítica y como ligando de afinidad para los posteriores procedimientos cromatográficos. Por ello, una fracción de dicha mezcla de fracciones fue concentrada y diafiltrada contra PBS, obteniendo una solución de $2,3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ del reactivo, lista para emplearse en el desarrollo de las metodologías de detección y cuantificación. El resto fue dializado contra solución de acoplamiento para su inmovilización en una matriz de *Sepharose*

activada con CNBr. Se obtuvo así una solución final con una concentración de 1,25 mg.mL⁻¹, equivalente a una masa total de anticuerpo de 150 mg.

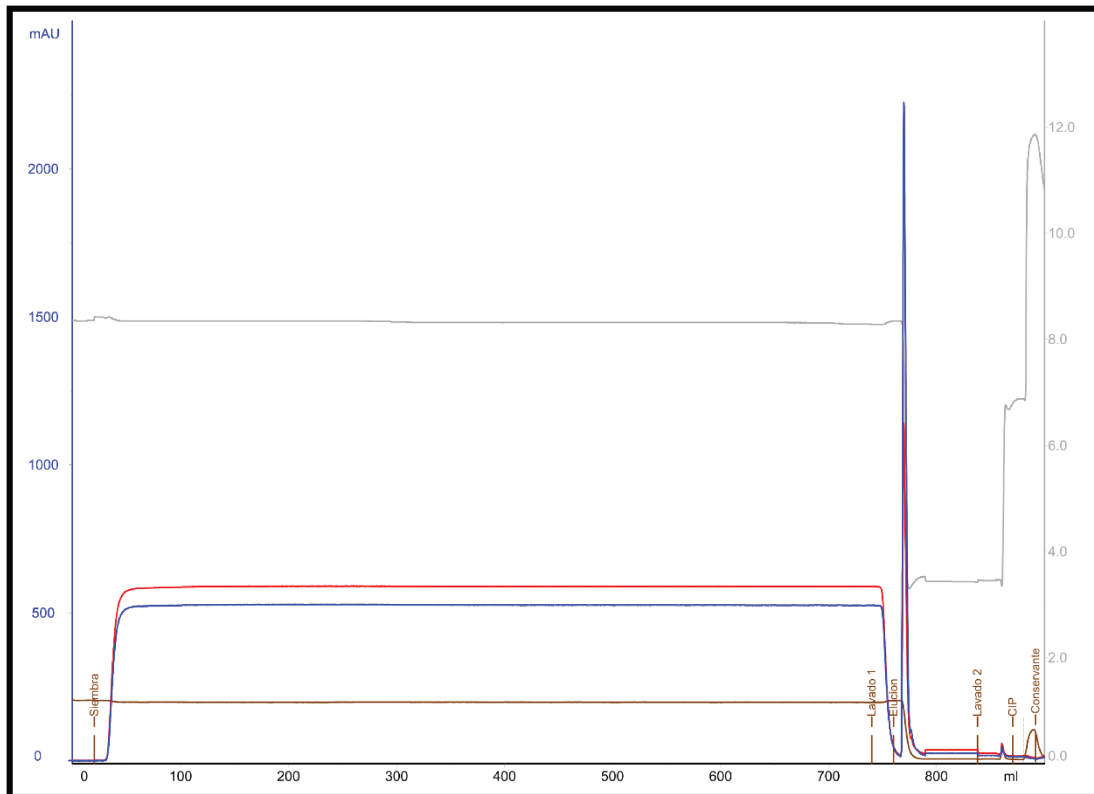


Figura 16: Purificación del mAb CC1H7 mediante cromatografía de afinidad a proteína A. En el cromatograma representativo se muestran las señales de absorbancia a $\lambda=280$ nm (azul), a $\lambda=254$ nm (rojo), conductividad (marrón) y pH (gris) en función del volumen de elución. Se indican las etapas de equilibrado, siembra, lavados, elución, *cleaning-in-place* (CIP) y agregado de conservante de la matriz.

El análisis por SDS-PAGE con tinción con azul brillante de *Coomassie* confirmó la integridad y pureza del mAb, por lo que se consideró adecuado para su uso como ligando en la CIA de las variantes de fusión correspondientes (Fig. 17).

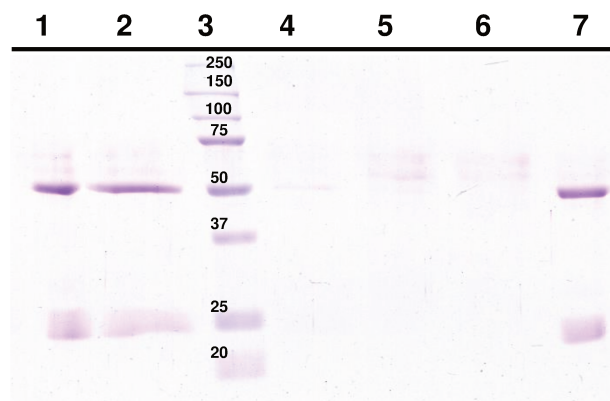


Figura 17: Evaluación de la pureza del mAb CC1H7 purificado a partir del sobrenadante de cultivo por cromatografía de afinidad a proteína A. Calles: 1- Sobrenadante; 2- FT; 3- Marcador de masa molecular (MMM); 4 a 6- Lavado; 7- Elución del mAb CC1H7.

1.2. Evaluación del sistema mGMOP-mAb CC1H7 como herramienta para la purificación de proteínas de fusión: optimización de una CIA

Un protocolo de purificación adecuado y eficiente debe permitir la obtención del analito con un elevado grado de pureza utilizando la menor cantidad posible de etapas, con el fin de minimizar la pérdida de material. Esta consideración adquiere especial relevancia cuando la proteína de interés se produce a partir de un cultivo de células animales ya que, por lo general, estos sistemas suelen presentar niveles de expresión más bajos en comparación con otros sistemas como bacterias o levaduras recombinadas (Ordoño y col., 2006).

Al momento de diseñar una CIA, es fundamental tener en cuenta que las condiciones de unión y elución constituyen factores clave para el éxito del método. La solución que acondiciona al anticuerpo inmovilizado en la matriz debe favorecer una unión rápida y eficiente del analito. Generalmente, se emplean soluciones de pH neutro que simulan condiciones fisiológicas, lo que permite alcanzar constantes de equilibrio de unión en el rango de 10^6 – 10^{12} M^{-1} . En cuanto a la elución, la solución debe facilitar la liberación rápida del analito retenido, sin comprometer la integridad ni la capacidad de regeneración del anticuerpo inmovilizado. Esta etapa suele lograrse mediante una disminución temporal de la fuerza de unión entre el anticuerpo y su ligando (Moser y Hage, 2010). A continuación, se detalla la preparación de la matriz de IAF y la puesta a punto experimental de las condiciones de unión y de elución.

1.2.1. Preparación de matrices de IAF mediante inmovilización del mAb CC1H7

Teniendo en cuenta la relación sugerida por el proveedor (5 mg de mAb por mL de resina), se inmovilizaron 135 mg de anticuerpo purificado y dializado contra la solución de acoplamiento en 27 mL de una resina de *Sepharose* activada con CNBr, con el fin de preparar la matriz de IAF. Para evaluar el porcentaje de anticuerpo unido, se determinó la concentración de Igs en la solución previa y posterior a la reacción de inmovilización, obteniéndose un valor de 85%.

La capacidad teórica de la resina se estimó en función de la masa de anticuerpo efectivamente inmovilizado, considerando que cada molécula de mAb (150 kDa) es capaz de ligar, al menos, una molécula de mGMOP-IFN (21 kDa). Por lo tanto, 115 mg de mAb (0,8 μ mol) serían capaces de unir 0,8 μ mol de mGMOP-IFN, lo que corresponde a una capacidad teórica 0,6 mg de mGMOP-IFN por mL de resina. Con la misma lógica, se obtuvo una capacidad teórica de 1,06 mg de mGMOP₃-IFN-mGMOP (~32 kDa) por mL de resina. Este cálculo se realizó siguiendo la ecuación (7) presentada en la sección 7.1.1 de MyM. Estos valores se consideraron adecuados para el procedimiento de purificación. Sin embargo, cabe mencionar que, según se encuentra reportado en la bibliografía (Ceaglio y col., 2008), las capacidades reales suelen representar alrededor del 40% de las capacidades teóricas en columnas con densidades de ligando de 2-3 mg por mL de gel. Esta diferencia podría deberse a que una fracción del mAb puede inmovilizarse a través de su porción F(ab), lo que bloquea o reduce su capacidad de unión al

antígeno. Además, la superficie de la resina no es completamente accesible a moléculas de gran tamaño, lo cual limita aún más su utilización efectiva.

1.2.2. Optimización de las condiciones de unión mGMOP-mAb CC1H7

La interacción entre el mAb CC1H7 y el epítopo APARSPS, tanto en el contexto del hGM-CSF como fusionado al hIFN ha sido caracterizada preliminarmente en el laboratorio, demostrando una dependencia atípica de la fuerza iónica, evidenciada por un aumento de la K_A en presencia de NaCl 1 M. Específicamente, se reportaron incrementos de 3,4 y 3,8 veces en la K_A para la interacción del anticuerpo con la etiqueta fusionada a hIFN y con hGM-CSF, respectivamente. Una mayor fuerza iónica disminuye la solvatación y facilita el acercamiento entre las superficies de unión, favoreciendo la interacción mAb-péptido. En el epítopo APARSPS, la deshidratación local podría exponer zonas hidrofóbicas, permitiendo un contacto más estrecho con el paratope y potenciando el reconocimiento molecular (Perotti y col., 2013). Sobre la base de estas observaciones, se decidió evaluar el efecto de distintas sales sobre la interacción entre el péptido mGMOP y el mAb CC1H7, con el objetivo de optimizar la CIA mediante un DoE.

1.2.2.1. Selección del tipo de sal, rango de concentraciones y pH

Para maximizar el incremento de afinidad del mAb CC1H7 por el péptido mGMOP, se seleccionaron distintas sales en función de la serie de Hofmeister, que clasifica a los iones según su capacidad para modular los efectos hidrofóbicos, y considerando además su uso habitual en cromatografía de interacción hidrofóbica. Se priorizó la elección de sales cosmotrópicas, que reducen más eficazmente la solvatación de las proteínas potenciando la interacción hidrofóbica y favoreciendo la unión entre el epítopo y el mAb. Siguiendo este criterio, se seleccionaron las siguientes sales: NaCl, KCl, Na₂SO₄, (NH₄)₂SO₄ y NH₄CH₃CO₂ (en adelante, NH₄Ac).

Los rangos de concentración salina se definieron mediante un *screening* inicial para identificar las condiciones que incrementan la afinidad aparente de la unión mGMOP-mAb CC1H7. En este ensayo se evaluó el efecto de las sales comparando la incubación de mGMOP-IFN en su presencia o su ausencia, a pH 7, siguiendo la metodología descrita en la sección 7.1.2.1 de MyM (Fig. 18).

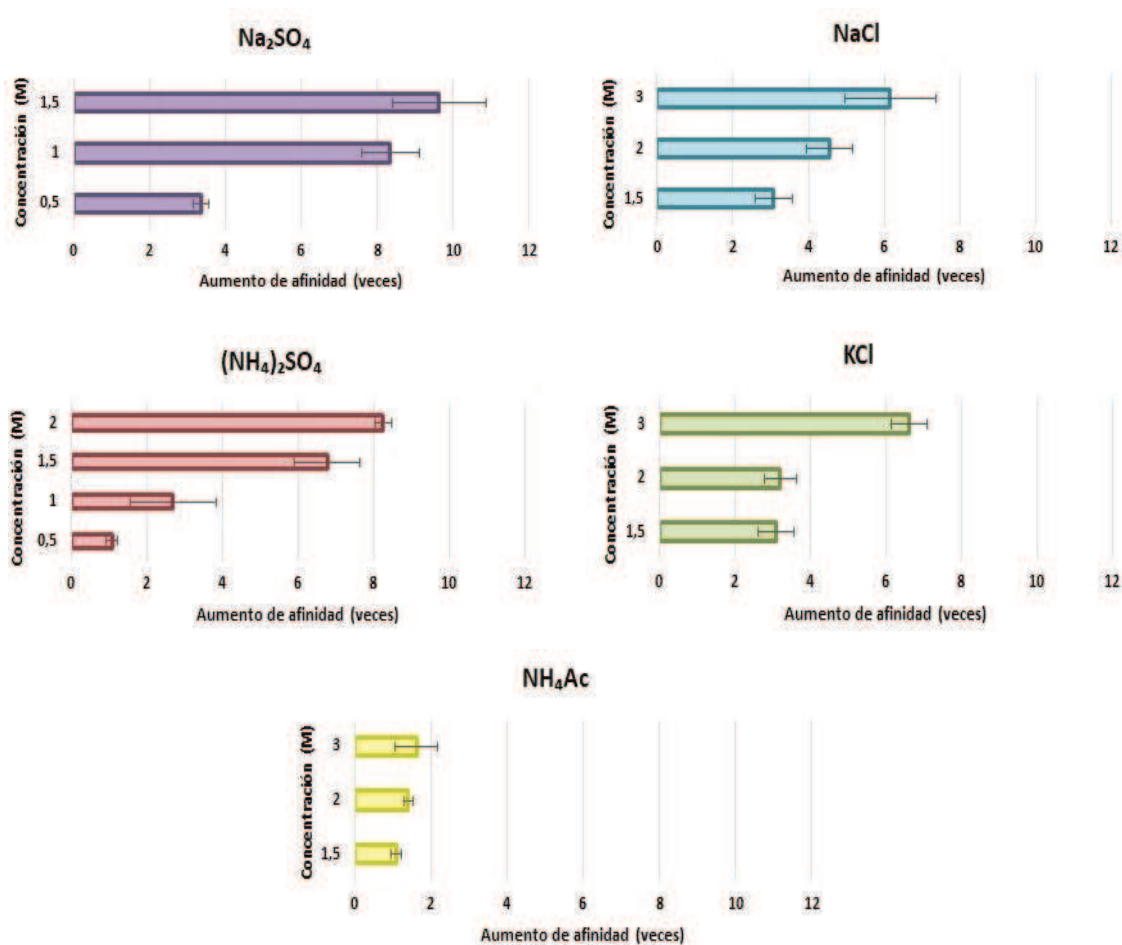


Figura 18: Incremento de la afinidad del mAb CC1H7 por el péptido mGMOP inducido por sales cosmotrópicas. La evaluación se realizó utilizando la proteína de fusión mGMOP-IFN.

En la mayoría de las condiciones ensayadas, el aumento de la concentración de sal se asoció con un incremento en la afinidad entre el péptido mGMOP y el mAb CC1H7, con excepción del acetato de amonio. Los mayores incrementos se observaron en presencia de sales de sulfato (8 a 10 veces con respecto de la condición sin sal), seguidas por los cloruros (aproximadamente de 7 veces), mientras que el NH₄Ac mostró un aumento de menor magnitud (máximo ~2 veces). Como consecuencia, esta sal fue excluida de optimizaciones posteriores, ya que el objetivo era alcanzar un aumento mínimo de la afinidad aparente de 3 veces, según los valores reportados previamente mediante la utilización de NaCl 1 M. En casi totalidad de los casos, la afinidad aparente aumentó con la concentración de sal, exceptuando al acetato de amonio, independientemente del tipo de anión o catión. Por esta razón, además de evaluar la afinidad, se analizó la solubilidad de cada sal para evitar condiciones que pudieran inducir la precipitación de la proteína en el entorno experimental. La solubilidad de las sales se evaluó en sobrenadantes de cultivo a 4 °C (temperatura de la purificación), partiendo de una concentración inicial de 0,5 M y tomando como concentración de referencia su solubilidad en agua (Tabla 4).

Tabla 4: Solubilidad de las sales en sobrenadantes de cultivo. Se indica la máxima concentración de cada sal antes de que se observe precipitación

	NaCl	KCl	Na ₂ SO ₄	(NH ₄) SO ₄
Concentración máxima (M)	4,5	3,8	1,0	1,3

El impacto de las distintas condiciones sobre la funcionalidad del mGMOP-IFN se evaluó mediante ensayos de actividad antiviral. Para ello, se analizó la actividad residual luego de una incubación a 4 °C durante toda la noche, con la concentración máxima de sal que no provoca precipitación y que, además, produce el mayor incremento de afinidad. Los resultados mostraron que NaCl, KCl y Na₂SO₄ no afectaron significativamente la actividad antiviral, que se mantuvo entre el 90 y el 100% respecto a la observada en ausencia de sal, mientras que (NH₄)₂SO₄ la redujo drásticamente a un 14%. En consecuencia, se seleccionaron NaCl, KCl y Na₂SO₄ para continuar con el análisis.

Por otro lado, debido a que las variaciones de pH pueden favorecer la liberación de moléculas de agua desde la superficie de la proteína, aumentando la exposición de las regiones hidrofóbicas (Hackemann y Hasse, 2017), también fue necesario evaluar el efecto de las sales a diferentes pH. El rango seleccionado se determinó considerando los posibles efectos sobre la afinidad sin inducir desnaturalización ni cambios extremos en la protonación de los residuos críticos para la interacción. Teniendo en cuenta estos factores, se definieron los rangos de trabajo a evaluar en el DoE (Tabla 5).

Tabla 5: Factores y Niveles seleccionados para el DoE. Se muestran los rangos de concentración y pH de cada sal, utilizados para definir las condiciones de unión en la CIA. Cada tipo de sal se consideró como una corrida experimental independiente

FACTORES			
	Tipo de Sal	Concentración (M)	pH
NIVELES POR SAL	NaCl	4,00 – 4,25 – 4,50	6 – 7 – 8
	KCl	3,25 – 3,50 – 3,75	6 – 7 – 8
	Na ₂ SO ₄	0,5 – 0,75 – 1,00	6 – 7 – 8

1.2.2.2. Determinación de las condiciones óptimas de unión entre mGMOP-mAb CC1H7 mediante DoE

A partir de las condiciones seleccionadas, se llevó a cabo un diseño factorial completo 2³ para cada sal, tomando como variable de respuesta el incremento de afinidad, determinado mediante ensayo de ELISA (sección 7.1.2.1 de MyM). Para ello, se han efectuado repeticiones del punto central sin incluir repeticiones en los puntos del factorial, lo que permite estimar la posible presencia de curvatura disminuyendo el número de réplicas. Los resultados se ajustaron a modelos cuadráticos utilizando el *software* Design Expert 7.0, los términos se seleccionaron aplicando el método de regresión múltiple hacia atrás (en inglés, *backward regression*)

eliminando iterativamente los términos no significativos con un nivel de exclusión de $\alpha=0,05$. Los modelos finales incluyen únicamente los términos que contribuyeron significativamente al ajuste. Los coeficientes de los modelos para cada sal se presentan en la Tabla 6. En todos los casos, el *lack-of-fit* resultó no significativo, lo que indica que no existen discrepancias sistemáticas entre los valores experimentales y los predichos por el modelo. Asimismo, los valores de R^2 ajustado indican una alta correlación, confirmando la calidad del ajuste.

Tabla 6: Modelos ajustados para cada sal evaluada en el DoE. Se presentan los parámetros de cada modelo, la condición óptima estimada y el incremento de afinidad para mGMOP-IFN

Condición	Modelo	Coefficientes	ANOVA	Lack-of fit	R ² aj	Condición óptima	Incremento Afinidad
Na₂SO₄	Cuadrático	A (9,92)	<0,0001	0,7934	0,9976	1 M	43
		B (6,83)					
		AB (9,07)					
		A ² (5,23)					
		B ² (6,07)					
NaCl	Cuadrático	A (2,96)	0,0019	0,8557	0,7679	4,5 M	39
		B (-4,25)					
		B ² (-6,92)					
KCl	Cuadrático	A (5,11)	0,0142	0,9484	0,7498	3,75 M	43
		AB (0,43)					
		A ² (-1,28)					
		B (3,69)					
		B ² (-10,08)					
		A ² B (-1,36)					

Las superficies de respuesta correspondientes a cada modelo se muestran en la Fig. 19. Para determinar las condiciones óptimas, se priorizó el incremento de afinidad entre mGMOP-IFN y el mAb CC1H7, asignando igual importancia a la concentración salina y el pH, dentro de sus respectivos rangos de estudio. Como se observa en la Tabla 6, el incremento de afinidad fue similar entre las tres sales.

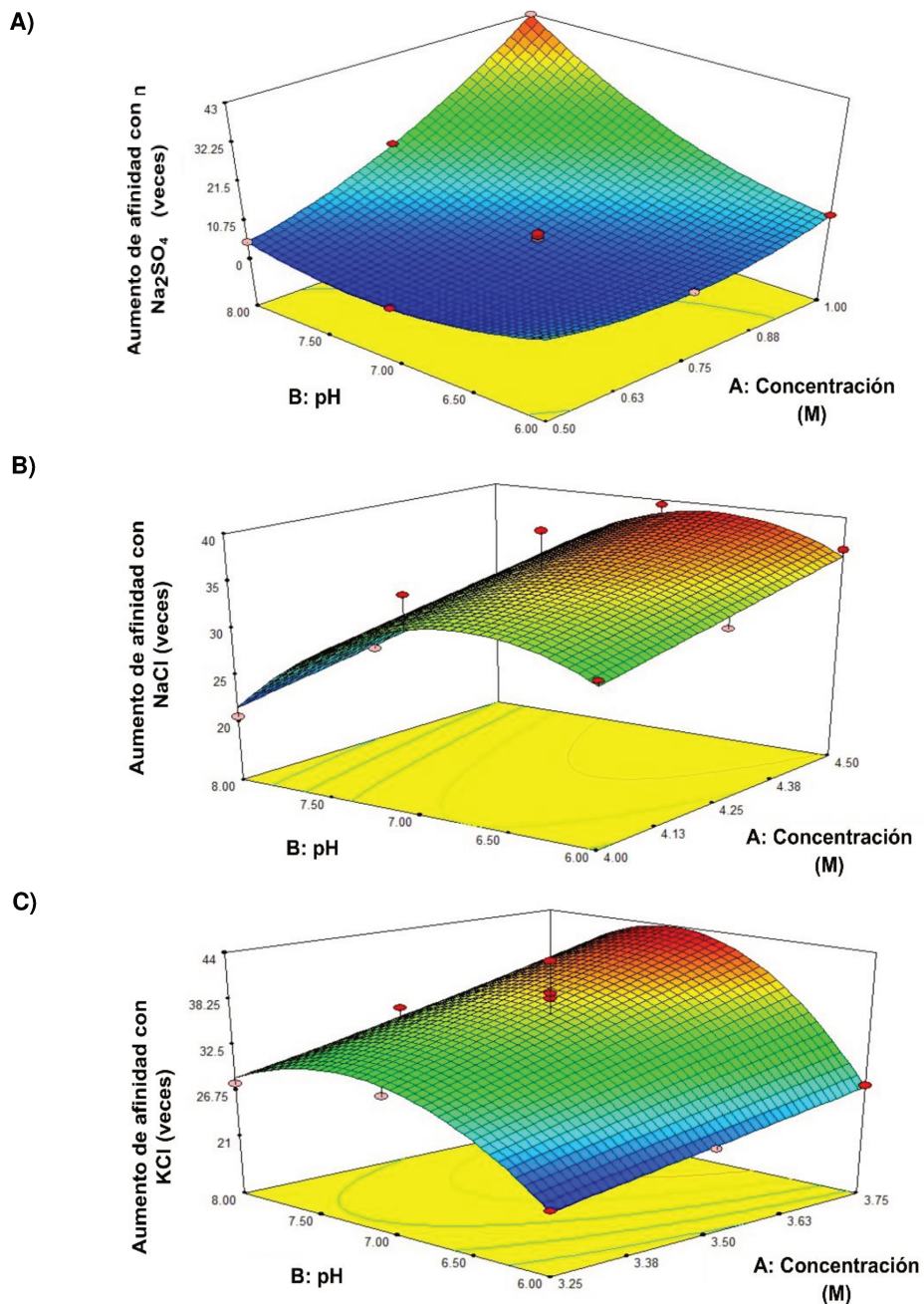


Figura 19: Superficies de respuesta de la interacción mGMOP-mAb CC1H7. Se muestran los efectos del pH y la concentración de sal sobre el incremento de afinidad (variable de respuesta) para cada sal evaluada. **A)** Na_2SO_4 (óptimo 1 M, pH 8). **B)** NaCl (óptimo 4,50 M, pH 6,7). **C)** KCl (óptimo 3,75 M, pH 7,5).

1.2.2.3. Determinación de la DBC para cada condición salina

Con el propósito de validar en cromatografía las condiciones óptimas obtenidas por DoE, se evaluó la DBC para cada sal en comparación con una condición control sin sal (pH 7). De este modo, se generaron curvas de *breakthrough* utilizando dos variantes de rhIFN fusionadas al *tag*: mGMOP-IFN y mGMOP₃-IFN-mGMOP. El volumen de carga se calculó en función de la concentración promedio de las proteínas en las cosechas y de una capacidad teórica de unión de 600-900 μg de proteína por mL de resina (según la variante analizada). Se utilizó una

columna empaquetada con 2 mL de mAb CC1H7-*Sepharose*. Los sobrenadantes de cultivo se acondicionaron mediante la adición de la sal correspondiente y ajustando el pH a las condiciones óptimas definidas por el DoE, asegurando que la masa de proteína cargada fuera consistente en todas las condiciones. La DBC se definió como la cantidad de proteína retenida en la resina cuando la concentración presente en el FT alcanzó el 10% de la concentración inicial en la siembra ($C/C_0 = 0,1$).

En la Fig. 20 se muestran las curvas de *breakthrough* para mGMOP-IFN (Fig. 20A) y mGMOP₃-IFN-mGMOP (Fig. 20B), donde puede observarse que en ningún caso se detectó proteína en las primeras fracciones del FT, ya que toda la proteína sembrada fue retenida por la columna. No obstante, se registró pérdida de proteína en una etapa temprana, alrededor de 15-20 mL de siembra, reflejando una reducción de los sitios disponibles de unión al mAb inmovilizado. Si bien esta pérdida aumentó con el volumen de siembra, fue más lenta cuando la proteína se cargó en presencia de cualquiera de las sales para ambas variantes. En concordancia, las pendientes de las líneas de tendencia fueron de 0,005 y 0,004 para mGMOP-IFN y mGMOP₃-IFN-mGMOP en la condición sin sal, respectivamente y entre 0,002-0,003 para ambas proteínas en presencia de sal, lo que indica que la elevada fuerza iónica aumenta la afinidad y estabiliza la interacción mGMOP-mAb CC1H7, ralentizando la saturación de los sitios de unión y permitiendo cargar mayor masa en el mismo volumen de matriz.

Además, las sales podrían reforzar la interacción específica, minimizando interferencias de cargas electrostáticas no específicas y favoreciendo la predominancia de interacciones hidrofóbicas u otros factores.

Por otra parte, ninguna condición ensayada alcanzó una relación $C/C_0=1$, lo que indica que no se alcanzó la saturación de los sitios de interacción de la resina, a pesar de sembrar un exceso de proteína respecto a la capacidad teórica. Para la variante mGMOP-IFN, el valor máximo de C/C_0 en la condición sin sal fue 0,4, mientras que en presencia de sales no superó un valor de 0,2. En contraste, para mGMOP₃-IFN-mGMOP, el valor máximo (0,4) se obtuvo tanto en la condición sin sal como con NaCl, mientras que en las demás condiciones los valores oscilaron entre 0,2 y 0,3. Estos resultados reflejan una retención eficiente del péptido y un equilibrio dinámico de unión y desorción entre mGMOP-IFN y el mAb CC1H7, que deja sitios libres disponibles dentro del tiempo evaluado.

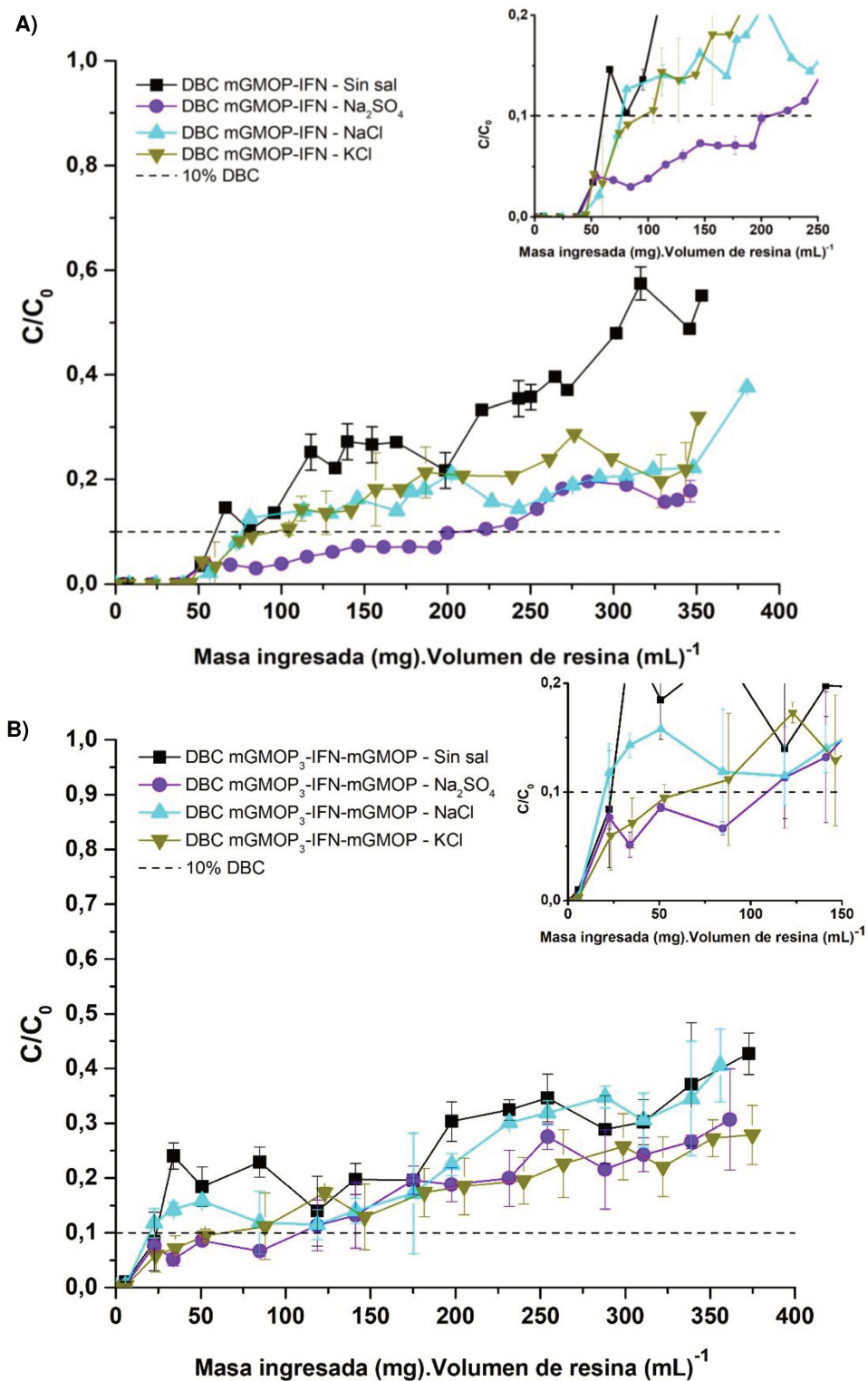


Figura 20: Curvas de *breakthrough* para la matriz de IAF mAb CC1H7-Sepharose utilizada para purificar las variantes: **A)** mGMOP-IFN y **B)** mGMOP₃-IFN-mGMOP. Se graficó la relación C/C_0 en función de la masa ingresada a la columna por el volumen de resina utilizado. C corresponde a la concentración de cada variante en las fracciones del FT y C_0 a la concentración en la muestra sembrada, ambas determinadas por ELISA sándwich. La línea punteada ($C/C_0=0,1$) indica el punto en el cual la concentración en el FT alcanza el 10% de la concentración en la siembra y se utilizó para calcular la DBC, definida como la cantidad de proteína retenida en ese punto. En la parte superior se observa una ampliación de los puntos de ruptura para cada una de las condiciones evaluadas.

Se observó, además, que la mayor DBC se alcanzó con Na₂SO₄ 1 M, pH 8, superando significativamente a los otros tratamientos con sal y mostrando un incremento aproximado de 3,5 veces con respecto a la condición sin sal, tanto para mGMOP-IFN como mGMOP₃-IFN-mGMOP. Las demás sales no mostraron mejoras significativas respecto a la condición sin sal e incluso, en algunos casos, redujeron la DBC (Tabla 7).

Tabla 7: Capacidad dinámica de la resina mAb CC1H7-*Sepharose* para mGMOP-IFN y mGMOP₃-IFN-mGMOP bajo distintas condiciones de unión y evaluada al 10% de C₀

Condición de unión	DBC mGMOP-IFN ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	DBC mGMOP ₃ -IFN-mGMOP ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Sin sal	64 ± 7	38 ± 10
Na ₂ SO ₄ 1 M – pH 8	227 ± 19	135 ± 34
NaCl 4,5 M – pH 6,7	50 ± 15	25 ± 9
KCl 3,75 M – pH 7,5	70 ± 14	58 ± 5

*El valor ± corresponde a la desviación estándar del ensayo de cuantificación por ELISA (n=3). No se realizaron réplicas independientes de la evaluación de la DBC.

En todas las condiciones evaluadas, mGMOP₃-IFN-mGMOP presentó valores de DBC menores que mGMOP-IFN, lo que podría atribuirse al mayor tamaño y mayor abundancia de sitios de O-glicosilación cerca de la región de unión al anticuerpo. Esto podría dificultar el acceso por efectos estéricos y aumentar la repulsión electrostática debido a los glicanos cargados negativamente. Además, la potencial interacción de los residuos de arginina del epítopo con aminoácidos cargados negativamente en el paratope mediante puentes salinos podría verse afectada por las cargas negativas de los glicanos cercanos. En condiciones dinámicas, esto afecta significativamente la unión de proteínas hiper-O-glicosiladas por interferencia electrostática (Oggero y col., 2004; Tsumoto y col., 1996).

Con respecto al efecto de las sales, la naturaleza divalente del anión sulfato favorece la interacción con grupos cargados, promoviendo una mayor unión de contraiones y la formación de dipolos en la superficie de la proteína. Esto contribuye a estructurar la capa de hidratación, aumentando las fuerzas de solvatación que estabilizan la proteína (Arosio y col., 2012).

Sobre la base de estos resultados, se seleccionó la condición de Na₂SO₄ 1 M (pH 8) para continuar con la optimización del protocolo de purificación utilizando la resina mAb CC1H7-*Sepharose*.

1.2.2.4. Determinación de las K_A para la interacción mGMOP-mAb CC1H7 bajo diferentes condiciones

El equilibrio de asociación-disociación entre el mAb CC1H7 y su antígeno se estudió mediante un ELISA que permite determinar la concentración de anticuerpo libre y, a partir de ella, cuantificar la constante de disociación (sección 7.1.2.4 de MyM). Esta metodología clásica

ofrece una serie de ventajas como practicidad, sencillez y rapidez, requiere pequeñas cantidades de reactivos, brindando una elevada sensibilidad, y evita el uso de marcaciones radiactivas o fluorogénicas.

El impacto de la condición Na_2SO_4 1 M (pH 8) sobre la K_A del mAb CC1H7 se evaluó para mGMOP-IFN y mGMOP₃-IFN-mGMOP. Las K_A se determinaron mediante gráficos de Scatchard, a partir de la pendiente de la regresión lineal ajustada a los datos experimentales (Fig. 21).

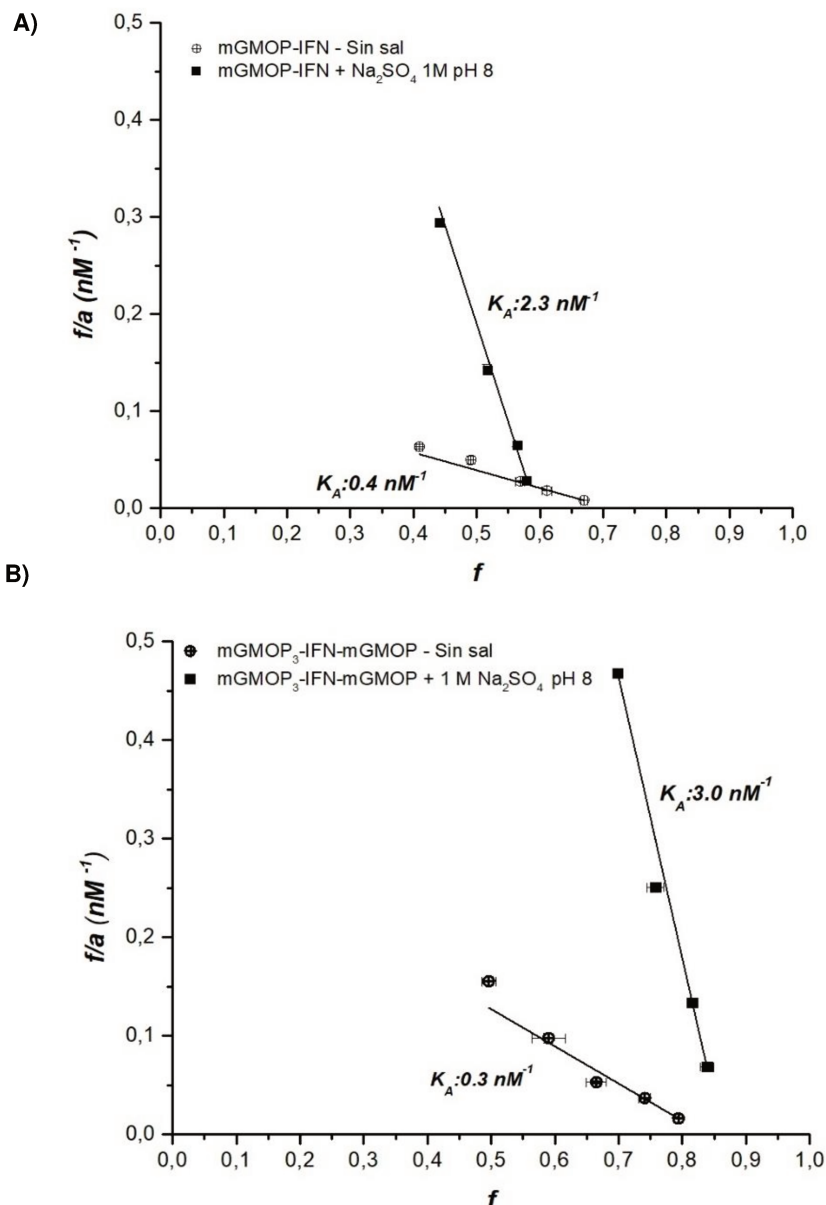


Figura 21: Gráficos de Scatchard para la determinación de la K_A . Se observa el efecto de Na_2SO_4 1 M (pH = 8) sobre la interacción entre el mAb CC1H7 y **A)** mGMOP-IFN y **B)** mGMOP₃-IFN-mGMOP.

Bajo las mismas condiciones experimentales, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la interacción de ambas variantes de rhIFN con el mAb. Sin embargo, la adición de Na_2SO_4 1 M (pH 8) incrementó notablemente la afinidad. La relación K_A sin sal/ K_A con

Na_2SO_4 indica un incremento de la afinidad en presencia de la sal de 6 veces para mGMOP-IFN y 10 veces para mGMOP₃-IFN-mGMOP.

Estos resultados explican el incremento de 3,5 veces en DBC observada bajo condiciones de alta fuerza iónica. Si bien las K_A muestran incrementos más marcados que los reflejados en la DBC, ambos parámetros se determinan mediante metodologías diferentes: la K_A en un ensayo estático (ELISA) y la DBC en un sistema dinámico (columna cromatográfica).

En condiciones estáticas, la estructura de mGMOP₃-IFN-mGMOP puede ser más sensible a las cargas negativas lo que contribuye a estabilizar su conformación y explicar su mayor aumento de afinidad al incubarse con sal. Sin embargo, en condiciones dinámicas intervienen factores adicionales como el tiempo de contacto, la difusión, el flujo y la saturación de la resina, que pueden limitar la efectividad de la interacción.

La dependencia atípica de la fuerza iónica en la interacción entre el mAb CC1H7 y el epítopo APARSPS, en comparación con otras interacciones antígeno-anticuerpo, concuerda con los hallazgos reportados por Dimitrov y col. (2009) y posteriormente retomados por Perotti y col. (2013). Estos autores señalaron que, en ciertos sistemas, la presencia de residuos cargados e hidrofóbicos en las superficies de unión crean un entorno molecular particularmente sensible a la fuerza iónica. En tales casos, un aumento de la misma puede favorecer la asociación antígeno-anticuerpo al incrementar la entropía del disolvente y reducir la solvatación en las superficies de unión permitiendo una aproximación más estrecha entre epítopo y paratopo. En el caso del epítopo APARSPS, que combina residuos no polares (Ala $\times 2$, Pro $\times 2$), polares sin carga (Ser $\times 2$) y un residuo cargado (Arg), este comportamiento podría deberse a una disminución de la capa de hidratación superficial, lo que refuerza las interacciones hidrofóbicas y de corto alcance responsables del reconocimiento molecular. A esta distancia, la fuerza de unión depende principalmente de la compatibilidad estructural entre ambas superficies, lo que explica la mayor estabilidad del complejo bajo condiciones de alta fuerza iónica.

1.2.3. Optimización de las condiciones de elución

La sensibilidad del epítopo APAR-paratopo CC1H7 frente a las variaciones en la fuerza iónica puede aprovecharse no sólo durante la etapa de unión del proceso cromatográfico, sino también como una posible estrategia de elución. En particular, se planteó que una disminución de la fuerza iónica combinada con un cambio de pH podría favorecer la desorción de la proteína sin comprometer su integridad.

Con este objetivo, se evaluaron 12 potenciales soluciones de elución para interrumpir la interacción entre el epítopo y el mAb, priorizando al mismo tiempo la preservación de la funcionalidad y estabilidad de las proteínas. La selección de los eluyentes se basó tanto en su uso frecuente en la CIA como en su diversidad de mecanismos de disociación (pH extremo,

fuerza iónica, agentes caotrópicos, detergentes, entre otros), lo que permitió un análisis comparativo amplio y racional.

1.2.3.1. Estabilidad del mAb CC1H7 en posibles soluciones de elución

La susceptibilidad del mAb CC1H7 frente diferentes soluciones de elución se evaluó mediante un ELISA que simula las condiciones de la CIA, según lo descrito en la sección 7.1.3.1 de MyM. Como condición control se utilizó PBS, que representa la unión máxima entre la proteína y el mAb. Este análisis tuvo como objetivo determinar la viabilidad de reutilización del anticuerpo acoplado a la resina en ciclos repetidos de CIA. Por este motivo, se trabajó únicamente mGMOP-IFN como proteína a ser detectada por el mAb, dado que, en este caso, la estabilidad del anticuerpo no depende de la variante proteica utilizada. Los resultados indican que, tras 25 min de incubación, el mAb mantuvo su funcionalidad de unión en la mayoría de las soluciones, con excepción de glicina a pH 2, donde la unión disminuyó un 80%. Luego de 60 min, se observaron tendencias similares: la capacidad de unión del anticuerpo se conservó en la mayoría de las soluciones de elución, pero se redujo un 94% en glicina a pH 2 y un 30% en SDS 0,5% (p/p) (Tabla 8). Estos hallazgos confirman reportes previos que indican que el pH ácido compromete la integridad de la interacción anticuerpo-antígeno (Perotti y col., 2013), pero destacan la robustez del mAb CC1H7 para aplicaciones basadas en IAF, debido a su notable estabilidad en una amplia variedad de soluciones de elución y agentes caotrópicos.

Tabla 8: Evaluación de la estabilidad del mAb CC1H7 y capacidad elutoria de potenciales soluciones de elución

Soluciones de elución	Estabilidad del mAb –	Estabilidad del mAb –	Retención mGMOP-IFN	Retención mGMOP ₃ -IFN-mGMOP
	25 min (%)	60 min (%)	(%)	(%)
MgCl ₂ 2 M	100 ± 8	91 ± 9	> 99	> 99
LiCl 3 M	100 ± 10	99 ± 10	> 99	> 99
Etilenglicol 25% (v/v)	100 ± 5	99 ± 8	61 ± 16	88 ± 16
SDS 0,5% (p/v)	95 ± 10	68 ± 8	< 1	< 1
NaSCN 0.5 M	100 ± 9	100 ± 7	13 ± 7	8 ± 5
Guanidina 2 M	100 ± 6	100 ± 8	> 99	90 ± 11
Urea 2 M	100 ± 5	100 ± 4	12 ± 2	8 ± 4
Agua Milli-Q	100 ± 3	100 ± 10	8 ± 5	16 ± 5
Glicina 100 mM, pH 2	21 ± 8	6 ± 1	< 1	< 1
Fosfato 50 mM, pH 9	100 ± 10	100 ± 4	< 1	< 1
Fosfato 50 mM, pH 10	98 ± 10	93 ± 3	<1	<1
Fosfato 50 mM, pH 11	100 ± 10	93 ± 3	< 1	< 1

1.2.3.2. Determinación de las condiciones de elución de las proteínas etiquetadas con mGMOP a partir de la matriz mAb CC1H7-*Sepharose*

Con el objetivo de identificar condiciones de elución adecuadas para debilitar la interacción mGMOP-mAb CC1H7, las soluciones de elución propuestas se evaluaron mediante un ensayo de ELISA sándwich tanto para mGMOP-IFN como para mGMOP₃-IFN-mGMOP (sección 7.1.3.2 de MyM). En este ensayo, una menor señal tras la incubación con cada solución indicó la desorción del antígeno (menor cantidad de proteína residual unida al mAb de captura), lo que permitió evaluar múltiples condiciones de elución sin necesidad de realizar un proceso cromatográfico completo.

Las soluciones de MgCl₂, LiCl, etilenglicol y guanidina presentaron una muy baja capacidad de elución, con porcentajes de retención entre 60% y 99%. La urea, NaSCN y agua evidenciaron un poder de elución significativamente mayor, con valores de retención entre 8% y 16%. Para el resto de las soluciones, la elución fue prácticamente completa. En estos casos, la señal del ELISA correspondiente al antígeno residual tras la incubación con la solución de elución fue indetectable, dando lugar a curvas de señal planas, con pendiente cercana a cero. Debido a la ausencia de señal cuantificable, no fue posible calcular porcentajes de retención, estimándose que la proteína retenida no superó el 1% de la masa total, equivalente a 4 ng (concentración mínima cuantificable). Cabe aclarar que en glicina pH 2 y SDS, la ausencia de retención probablemente se debió a la pérdida de estabilidad del mAb, y no a una elución eficiente del antígeno (Tabla 8).

En función de los resultados obtenidos por ELISA, se seleccionó la solución de fosfato de sodio a pH alcalino (entre 9 y 11) para la posterior optimización en condiciones dinámicas. El sobrenadante clarificado fue acondicionado con Na₂SO₄ 1 M pH 8 (condición óptima de unión) y aplicado a la columna cromatográfica. Luego de un único lavado con la misma solución de alta fuerza iónica, la elución se llevó a cabo utilizando fosfato 50 mM a pH 9, 10 y 11. La elución fue exitosa en todos los casos, observándose recuperaciones crecientes en forma concomitante con el pH: 50% para mGMOP-IFN y 70% para mGMOP₃-IFN-mGMOP a pH 9; 80% y 75% a pH 10; y los máximos rendimientos, 85% y 90%, a pH 11, respectivamente.

Las proteínas etiquetadas consisten en una amplia gama de isoformas con pI entre 3 y 5. A medida que el pH aumenta, las proteínas adquieren una mayor carga negativa debido a la desprotonación de los grupos carboxilo, mientras que la ionización del grupo guanidinio de la arginina disminuye. Esto debilita las interacciones electrostáticas con el mAb CC1H7, también cargado negativamente. A pH 9, se rompen principalmente interacciones más débiles entre el epítopo y el anticuerpo lo que produce una recuperación parcial y picos de elución más anchos con retorno lento a la línea de base. En estas condiciones, la liberación del antígeno depende en gran medida de procesos difusivos y de la cinética de disociación, por lo que parte del antígeno puede eluir lentamente o readsorberse parcialmente a la resina. A pH 10 se obtiene

un efecto intermedio, mientras que a pH 11 la desprotonación completa de los grupos carboxilo y la reducción de las interacciones específicas y no específicas facilitan la disociación del complejo mAb-antígeno y la interrupción más efectiva de las interacciones electrostáticas y los enlaces de hidrógeno. Esto resulta en la liberación de la mayor parte del antígeno y en la mayor recuperación a pH 11.

La elución inducida por cambio de pH estuvo acompañada por una disminución en la conductividad, indicando la remoción de sal durante esta etapa. La presencia de la sal durante el lavado resultó importante, ya que su eliminación provocó una liberación prematura, aunque incompleta, de la proteína antes de la elución propiamente dicha.

Los ensayos de actividad biológica confirmaron que el pH 11 no afectó la funcionalidad de ninguna de las variantes de rhIFN, manteniéndose el 100% de su potencia *in vitro* (sección 9.3.1.1 de MyM y 2.3.3.1 de RyD). Por lo tanto, el fosfato 50 mM a pH 11 podría establecerse como condición óptima de elución. No obstante, si otras proteínas etiquetadas fueran inestables a pH tan altos, podrían utilizarse pH más bajos (9 o 10) como compromiso entre eficiencia de elución y estabilidad proteica.

1.2.4. Protocolo optimizado de purificación mediante CIA. Determinación de parámetros cromatográficos

Los parámetros cromatográficos del protocolo optimizado para las variantes mGMOP-IFN y mGMOP₃-IFN-mGMOP fueron evaluados utilizando las condiciones previamente establecidas: unión mediante equilibrado y acondicionamiento de la muestra con Na₂SO₄ 1 M (pH 8) y elución con solución de fosfato 50 mM (pH 11). En la Fig. 22 se muestran los cromatogramas obtenidos para ambas variantes. El mismo protocolo se llevó a cabo sin sal para comparar los resultados. Como se muestra en la Tabla 9, para ambas variantes de rhIFN, la ausencia de Na₂SO₄ durante el proceso provocó una mayor pérdida de proteína en el FT y el lavado (27% versus 10% para mGMOP-IFN, y 33% versus 9% para mGMOP₃-IFN-mGMOP, respectivamente). Además, la recuperación durante la elución fue mayor con sal (80-90% versus 50%, en promedio). Por lo tanto, el uso de Na₂SO₄ 1 M pH 8 no solo incrementa la afinidad de la interacción mGMOP-mAb CC1H7 y, por ende, la capacidad de unión, sino que también mejora el proceso de elución. En este caso, la combinación de disminución de la fuerza iónica y aumento de pH resulta en mayores rendimientos que solo el cambio de pH. Estrategias similares de elución dual, como aumento de pH junto con reducción de la conductividad, han mostrado mayor eficiencia en la purificación de anticuerpos mediante columnas de intercambio iónico en comparación con gradientes simples (Lee y col., 2018), indicando que la combinación de factores suele optimizar la liberación de proteínas independientemente del mecanismo de retención.

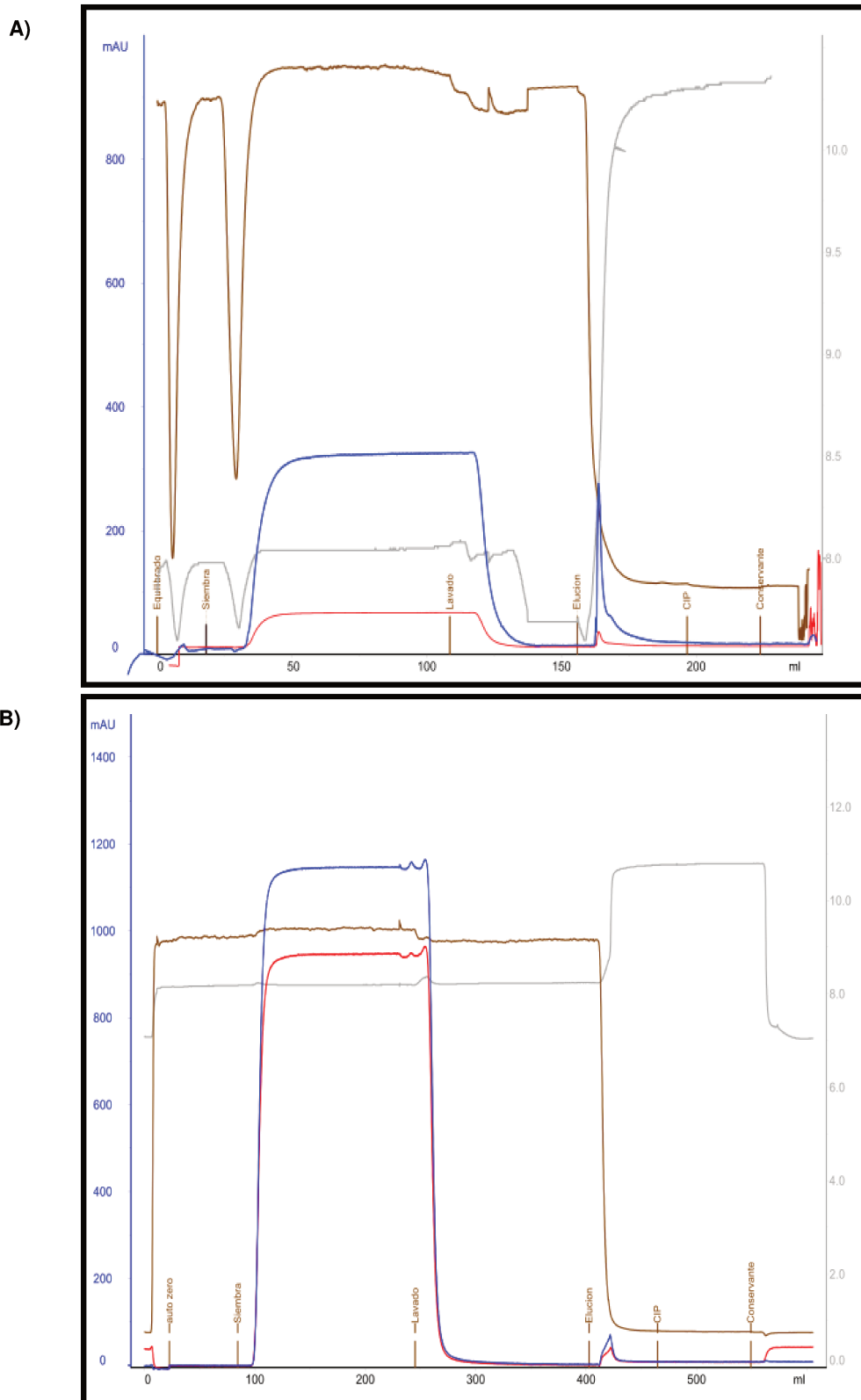


Figura 22: Purificación de A) mGMOP-IFN y B) mGMOP₃-IFN-mGMOP por CIA con mAb CC1H7, acondicionando la siembra con Na₂SO₄ 1M. En los cromatogramas se representan las señales de absorbancia a $\lambda = 280$ nm (azul), $\lambda = 254$ nm (rojo), conductividad (marrón) y pH (gris) en función del volumen de elución. Se señala, además, el inicio de las etapas de equilibrado, siembra, lavados, elución, CIP y conservante.

Tabla 9: Purificación del mGMOP-IFN y mGMOP₃-IFN-mGMOP mediante CIA empleando la matriz mAb CC1H7-*Sepharose*. Se comparan condiciones de unión con y sin Na₂SO₄ 1 M (pH 8). Se indica la recuperación y pureza obtenida en cada procedimiento cromatográfico

	mGMOP-IFN				mGMOP ₃ -IFN-mGMOP			
	Sin sal		Na ₂ SO ₄ 1 M, pH 8		Sin sal		Na ₂ SO ₄ 1 M, pH 8	
	Masa (µg)	%R	Masa (µg)	%R	Masa (µg)	%R	Masa (µg)	%R
Siembra	623		1042		1015		995	
FT	110	18	67	6	166	16	65	7
Lavado	55	9	44	4	168	17	24	2
Elución	331	53	890	85	589	58	907	91
%R global	80		95		91		100	
Pureza (%)	90		91		100		100	

El análisis por SDS-PAGE reveló que se alcanzaron niveles de pureza altos (90–100%) en todos los casos (Fig. 23). La cosecha proveniente del mGMOP-IFN contiene SFB, ya que la línea productora fue cultivada en adherencia. En consecuencia, en la calle 2 del gel se observa una banda de aproximadamente 66 kDa correspondiente a albúmina, la cual disminuyó considerablemente luego del proceso de purificación. En este sentido, cabe destacar que un único lavado fue suficiente para eliminar las impurezas presentes en el sobrenadante de cultivo en todas las condiciones evaluadas. El factor de purificación, previa determinación de las proteínas totales en cada etapa mediante el método de Bradford, indicó un aumento de pureza de aproximadamente 50 veces para ambas variantes luego de comparar las actividades específicas de la proteína de interés en la fracción de elución con respecto a su actividad específica en la muestra sembrada.

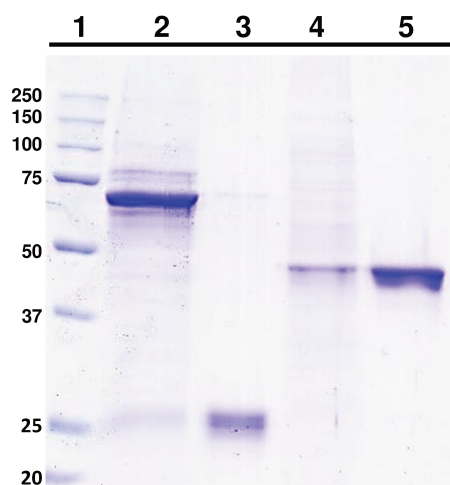


Figura 23: Evaluación de la pureza de mGMOP-IFN y mGMOP₃-IFN-mGMOP luego de su purificación por CIA en presencia de Na₂SO₄. Calles: 1- MMM 2- Sobrenadante de mGMOP-IFN; 3- Elución de mGMOP-IFN; 4- Sobrenadante de mGMOP₃-IFN-mGMOP; 5- Elución de mGMOP₃-IFN-mGMOP.

Para complementar la evaluación de la pureza de las proteínas purificadas mediante el método desarrollado, se llevaron a cabo análisis por SEC-UHPLC de las proteínas obtenidas a partir de la CIA con mAb CC1H7 y Na₂SO₄ 1 M. Los cromatogramas resultantes se presentan en la Fig. 24, mostrando picos de elución a 19,321 min para mGMOP-IFN y 15,825 min para mGMOP₃-IFN-mGMOP. Estos tiempos se aproximan a los 20–22 min reportados para la molécula de rhIFN (Grabarz y col., 2021); sin embargo, como era previsible, debido a su mayor contenido O-glicosídico y, por ende, a su mayor tamaño aparente, las proteínas hiper-O-glicosiladas eluyeron a tiempos menores. Los picos analizados exhibieron niveles de pureza comprendidos entre 89 y 99%, valores consistentes con los obtenidos mediante SDS-PAGE, lo que confirma la elevada pureza alcanzada en nuestras preparaciones.

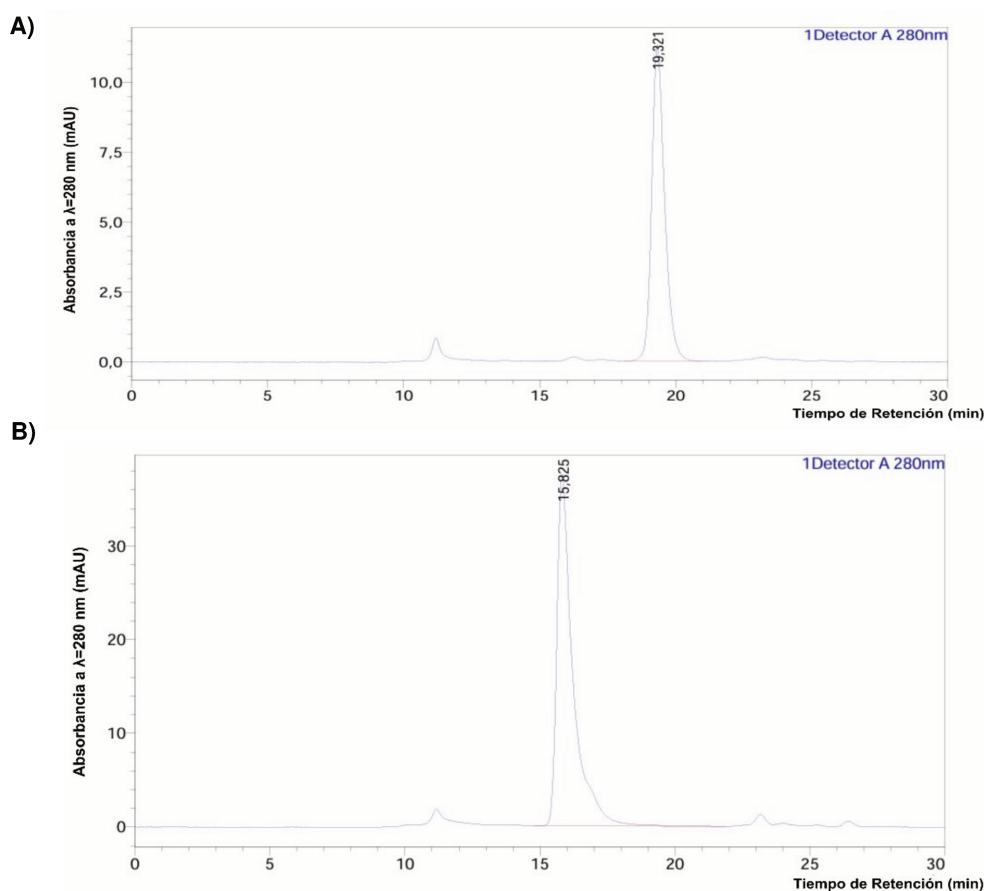


Figura 24: Evaluación de la pureza de A) mGMOP-IFN y B) mGMOP₃-IFN-mGMOP mediante SEC-UHPLC. Se registran los perfiles de elución a 280 nm y el tiempo de retención de las proteínas evaluadas.

Por último, la actividad biológica específica *in vitro* de las variantes de rhIFN purificadas con el mAb CC1H7 fue comparada con la obtenida para las proteínas purificadas mediante un método de referencia, consistente en una CIA con el mAb anti-IFN CA5E6 (Ceaglio y col., 2008), no detectándose diferencias significativas entre ellas.

En conclusión, se desarrolló un método simple y de un solo paso para la purificación de proteínas etiquetadas con una o más copias de mGMOP, alcanzando altos niveles de recuperación y pureza.

1.3. Empleo del sistema mGMOP-mAb CC1H7 para la cuantificación y detección de proteínas de fusión

1.3.1. Desarrollo de un método de cuantificación: ELISA de competición

Con el objetivo de contar con un método de cuantificación aplicable a cualquier variante que contenga el péptido mGMOP, independientemente de la proteína a la que esté fusionado, se diseñó un ELISA de competición mediante DoE. El ensayo se basa en la competición entre el antígeno inmovilizado en fase sólida (correspondiente al péptido mGMOP en el contexto de una proteína de fusión) con el antígeno en fase líquida por su unión al mAb CC1H7 en solución. Posteriormente, se mide la interacción remanente en fase sólida agregando un segundo anticuerpo anti-especie murina conjugado con la enzima peroxidasa, que dará lugar a la reacción colorimétrica. La metodología es versátil, ya que se basa exclusivamente en la interacción con el mAb CC1H7, sin necesidad de anticuerpos específicos adicionales para cada proteína diana. Esto resulta especialmente valioso cuando no se dispone de anticuerpos específicos contra la proteína de interés, evitando el uso de sueros policlonales (anticuerpos policlonales), que son reactivos limitantes y no pueden reproducirse con propiedades idénticas una vez agotados.

1.3.1.1. Selección de factores y evaluación preliminar

Para iniciar la optimización, se realizaron ensayos preliminares para definir los factores y niveles a incluir en el DoE.

En primer lugar, siguiendo la metodología descrita en la sección 6.1.3 de MyM, se tituló el mAb CC1H7 frente a ambas variantes para establecer la dilución óptima o concentración que genera el 50% de la máxima señal de absorbancia para emplear posteriormente en el ELISA de competición. La concentración de cada proteína inmovilizada fue determinada previamente en el laboratorio, siendo de 50 ng por pozo.

Como se observa en la Fig. 24, la curva de titulación del mAb frente a mGMOP-IFN muestra un desplazamiento hacia la derecha con relación a la curva de mGMOP₃-IFN-mGMOP. Esto indicaría que la misma señal de absorbancia se obtiene mediante diluciones más altas para la variante conteniendo mayor número de etiquetas. En efecto, el título correspondiente al 50% de la señal máxima fue de 1:21.000 para mGMOP-IFN, mientras que para mGMOP₃-IFN-mGMOP fue de 1:181.000.

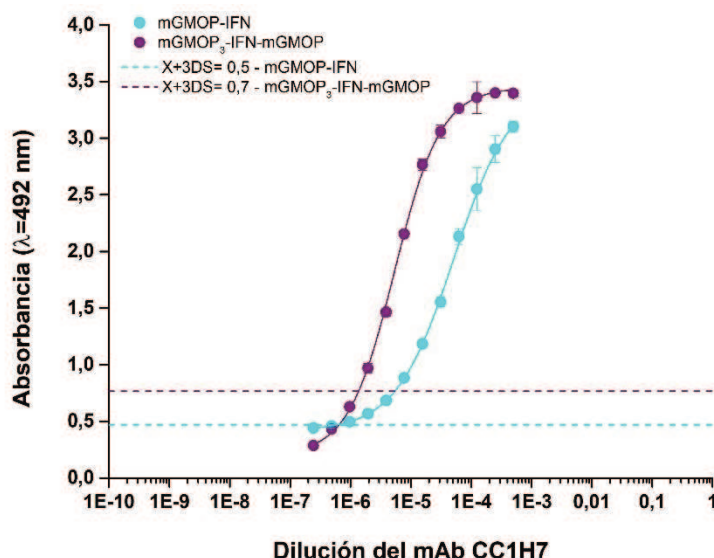


Figura 25: Titulación del mAb CC1H7 frente a mGMOP-IFN y mGMOP₃-IFN-mGMOP inmovilizadas en la placa.

A partir de esta condición se llevaron a cabo los primeros ensayos del ELISA de competición, propiamente dicho (sección 7.2 de MyM), utilizando 50 ng de ambas proteínas para la sensibilización, y la dilución del mAb correspondiente para mGMOP-IFN y mGMOP₃-IFN-mGMOP de acuerdo a lo obtenido en la titulación. Con estos parámetros, se evaluó el tiempo óptimo de incubación del complejo antígeno-anticuerpo antes de su adición a la placa sensibilizada (Fig 26).

En el caso de mGMOP-IFN, la preincubación durante 24 h produjo una curva levemente desplazada hacia la izquierda en comparación con las de 1 h y sin incubación (que prácticamente se superpusieron), lo que indica que se necesita una menor concentración de competidor para alcanzar la misma señal, reflejando así una mayor detectabilidad. Para mGMOP₃-IFN-mGMOP, la curva de 24 h se superpuso con la de 1 h, mientras que la curva sin incubación mostró un leve desplazamiento hacia la derecha. Para mGMOP-IFN, se observó un aumento de la pendiente con la preincubación de 24 h, mientras que para mGMOP₃-IFN-mGMOP, las pendientes fueron comparables entre sí. En ningún caso, el resultado del ensayo se vio afectado por el tiempo de preincubación. Dado que para mGMOP-IFN la preincubación de 24 h mejora tanto la detectabilidad como la pendiente, mientras que esta condición también resulta favorable para mGMOP₃-IFN-mGMOP, se seleccionó este tiempo para ambas proteínas.

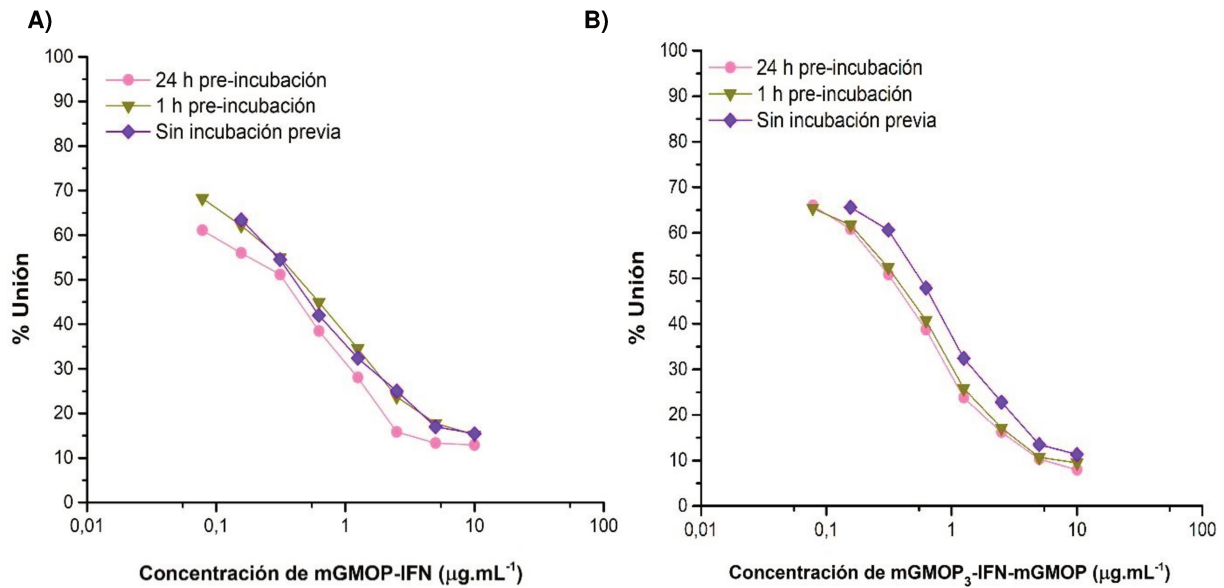


Figura 26: Evaluación del tiempo de preincubación. Curvas de ELISA de competición obtenidas empleando distintos tiempos de preincubación del complejo mAb CC1H7 con **A)** mGMOP-IFN y con **B)** mGMOP₃-IFN-mGMOP.

Posteriormente, se evaluó el efecto de diferentes tiempos de incubación del complejo antígeno-anticuerpo en la placa (tiempo de competición: 1, 3 o 24 h) (Fig. 27).

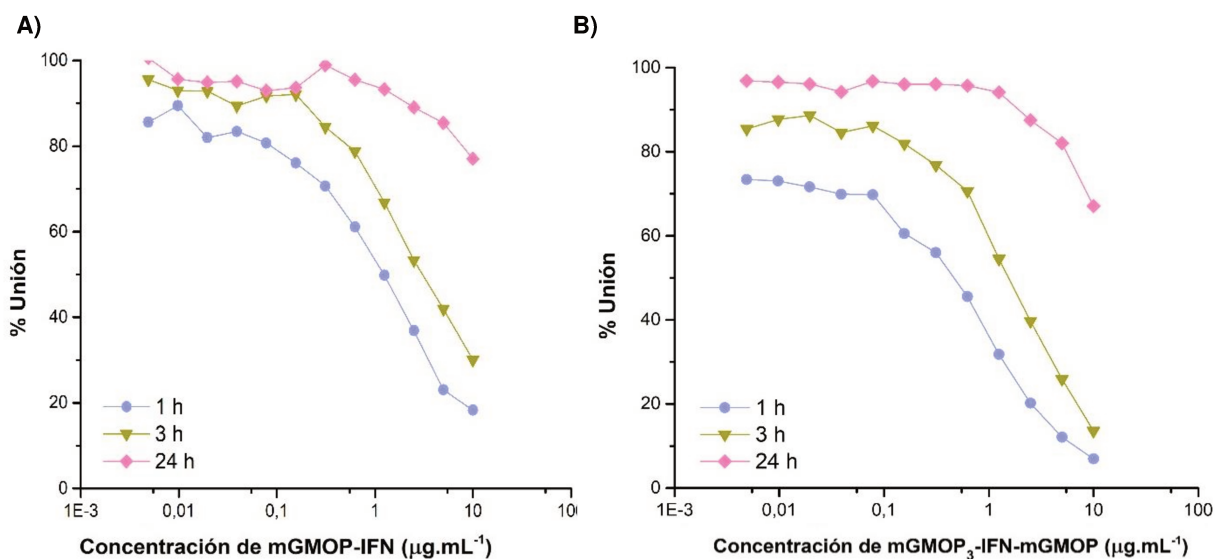


Figura 27: Evaluación del tiempo de competición. Curvas de ELISA de competición obtenidas empleando distintos tiempos de competición del mAb CC1H7 por **A)** mGMOP-IFN y **B)** mGMOP₃-IFN-mGMOP.

Para ambas proteínas, la incubación durante 24 h favoreció la unión del mAb al antígeno adsorbido en la placa, reduciendo la competencia con el antígeno soluble. Como consecuencia, las curvas se mantuvieron con altos porcentajes de unión incluso a concentraciones elevadas de antígeno soluble, lo que sugiere una disminución de la sensibilidad y el incremento del LOD del ensayo. Además, este comportamiento podría deberse a la saturación del anticuerpo o a

fenómenos de reequilibrio durante la incubación prolongada. Por estas razones, se descartó el tiempo de 24 h para su uso en el ELISA de competición. En cambio, las curvas correspondientes a 1 y 3 h mostraron un descenso dependiente de la concentración y un desplazamiento hacia la izquierda respecto de la condición de 24 h, indicando que una menor concentración de antígeno soluble es suficiente para competir eficazmente por la unión al anticuerpo. Esto refleja una mayor detectabilidad y capacidad discriminadora del ensayo, por lo que ambas condiciones se seleccionaron para su evaluación en DoE.

1.3.1.2. Determinación de las condiciones óptimas del ELISA de competición mediante DoE

Teniendo en cuenta los resultados de los ensayos de evaluación previa, se llevó a cabo un DoE tipo BBD, en el cual se incluyeron tres factores en tres niveles: tiempo de incubación en la placa (1, 2 y 3 h), masa de proteína inmovilizada (25, 62,5 y 100 ng) y dilución del conjugado anti-IgG de ratón-HRP establecida según las recomendaciones del fabricante para este tipo de ensayos y la de rutina en nuestro laboratorio (1:1000, 1:2000 y 1:3000).

Tabla 10: Modelo ajustado para las variantes de rhIFN. Se presentan los parámetros del modelo para las tres respuestas del DoE utilizado en la optimización del ELISA de competición

Respuesta	mGMOP-IFN			mGMOP ₃ -IFN-mGMOP		
	SEN	LOD	LOQ	SEN	LOD	LOQ
Modelo	Cuadrático	Cuadrático	Cuadrático	Cuadrático	Cuadrático	Cuadrático
Coefficientes	A (42.58)	A (0.15)	A (1.38)	A (18.21)	A (7.95)	B (0.31)
	B (3.39)	B (0.017)	B (0.15)	B (1.88)	B (0.014)	C (0.30)
	C (44.02)	C (0.016)	C (0.14)	C (40.13)	C (0.055)	BC (0.053)
	B ² (61.53)	AC (0.025)	AC (0.23)	BC (16.20)	A ² (0.038)	B ² (0.12)
		BC (0.036)	BC (0.33)	A ² (27.67)		C ² (0.11)
ANOVA	0.0048	0.0005	0.0005	<0.0001	0.0002	<0.0001
Lack-of fit	0.8983	0.9462	0.9462	0.4494	0.8660	0.3964
R²aj	0.7258	0.8611	0.8611	0.9405	0.8720	0.9315
Condición Óptima	25 ng de proteína para sensibilizar – 2.5 h tiempo de incubación – 1:1700 dilución del conjugado anti-mouse IgG-HRP			25 ng de proteína para sensibilizar – 2.5 h tiempo de incubación – 1:2700 dilución del conjugado anti-mouse IgG-HRP		

Los modelos se obtuvieron utilizando *backward regression* y se verificó el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homocedasticidad para cada una de las tres respuestas buscadas (SEN, LOD y LOQ). Las respuestas de ambas variantes se ajustaron a modelos cuadráticos. Como era de esperarse, la falta de ajuste no fue significativa y los valores de R-cuadrado

ajustado fueron altos, lo que indica una fuerte correlación entre los datos experimentales y el ajuste del modelo (Tabla 10).

Se aplicaron criterios de optimización simultánea, con el objetivo de maximizar la SEN y, al mismo tiempo, minimizar el LOD y el LOQ, asignando mayor peso a estas dos últimas respuestas. También se consideró la reducción de la masa de proteína utilizada para la sensibilización. En la Fig. 28 se muestra la función de deseabilidad para cada variante.

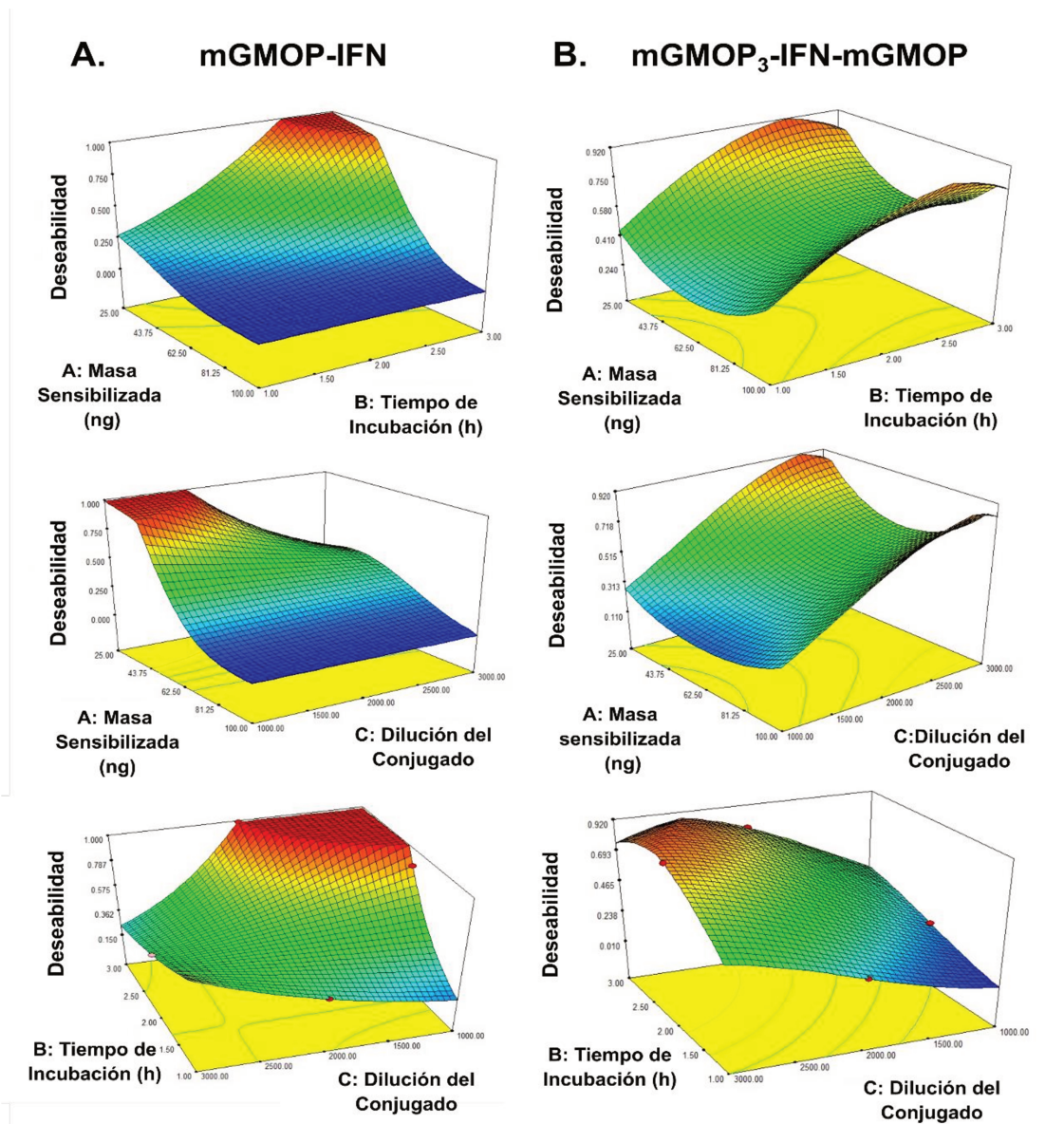


Figura 28: Superficies de respuesta de la función de deseabilidad para la optimización del ELISA de competición. Cada gráfico representa la optimización de dos factores, manteniendo el tercero fijo en su valor óptimo. **A)** mGMOP-IFN. **B)** mGMOP₃-IFN-mGMOP.

Bajo estos criterios, las condiciones seleccionadas fueron: 25 ng de proteína por pozo para la sensibilización; 2,5 h de incubación del complejo y dilución del conjugado de 1:1700 (para mGMOP-IFN) y 1:2700 (para mGMOP₃-IFN-mGMOP).

1.3.1.3. Validación del método

Para garantizar la exactitud y confiabilidad del ensayo, se validó el ELISA de competición utilizando la proteína de fusión hiperglicosilada tanto en solución de dilución como en medio de cultivo PM condicionado, con el fin de evaluar efectos de matriz. Las concentraciones fueron transformadas logarítmicamente para aproximar una distribución normal. Las curvas dosis-respuesta se ajustaron mediante modelo logístico, verificándose la normalidad y homocedasticidad de los residuos (Fig. 29).

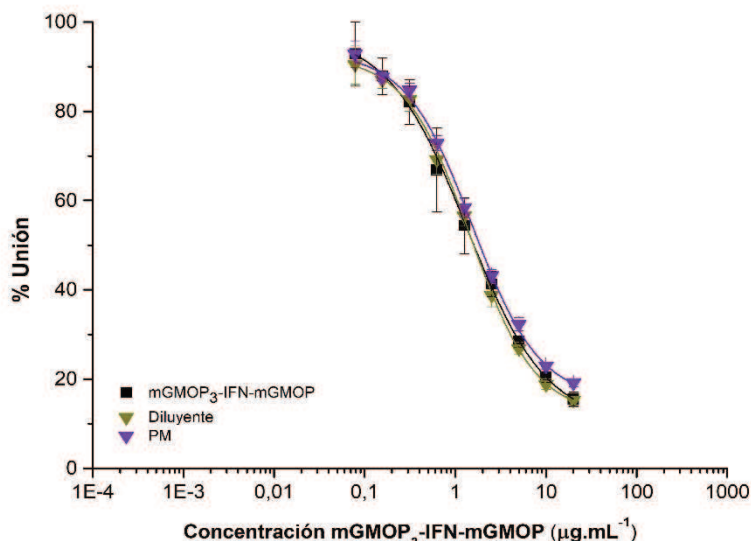


Figura 29: ELISA de competición para la variante mGMOP₃-IFN-mGMOP en diluyente y medio de cultivo PM condicionado. Se presentan las curvas de ensayos independientes (n=3) con valores promedio ± DS.

En la Tabla 11 se muestran las cifras de mérito calculadas.

Tabla 11: Cifras de mérito del ELISA de competición para la variante mGMOP₃-IFN-mGMOP, evaluadas en dos condiciones: solución de dilución y medio de cultivo PM. Se presentan los valores promedio ± DS

	mGMOP ₃ -IFN-mGMOP	
	Solución diluyente	Medio PM condicionado (Dilución 1:2)
LOD (µg.mL ⁻¹)	0,11 ± 0,03	0,14 ± 0,01
LOQ (µg.mL ⁻¹)	0,33 ± 0,09	0,43 ± 0,02
SEN (% unión. mL.µg ⁻¹)	45 ± 4	47 ± 2
SEN _γ (µg.mL ⁻¹)	34 ± 2	38 ± 2

Estos resultados muestran diferencias pequeñas y dentro de la variabilidad esperada para este tipo de ensayos. En consecuencia, el ELISA de competición permite detectar adecuadamente la proteína de interés tanto en diluyente como en medio de cultivo PM condicionado.

La exactitud del método se evaluó mediante un test EJCR utilizando un modelo de regresión BLS. En ambas condiciones, el punto ideal (1,0) se ubicó dentro de la elipse, lo que respalda el grado de concordancia entre el valor nominal y el determinado por el método analítico, confirmando así su exactitud (Fig. 30).

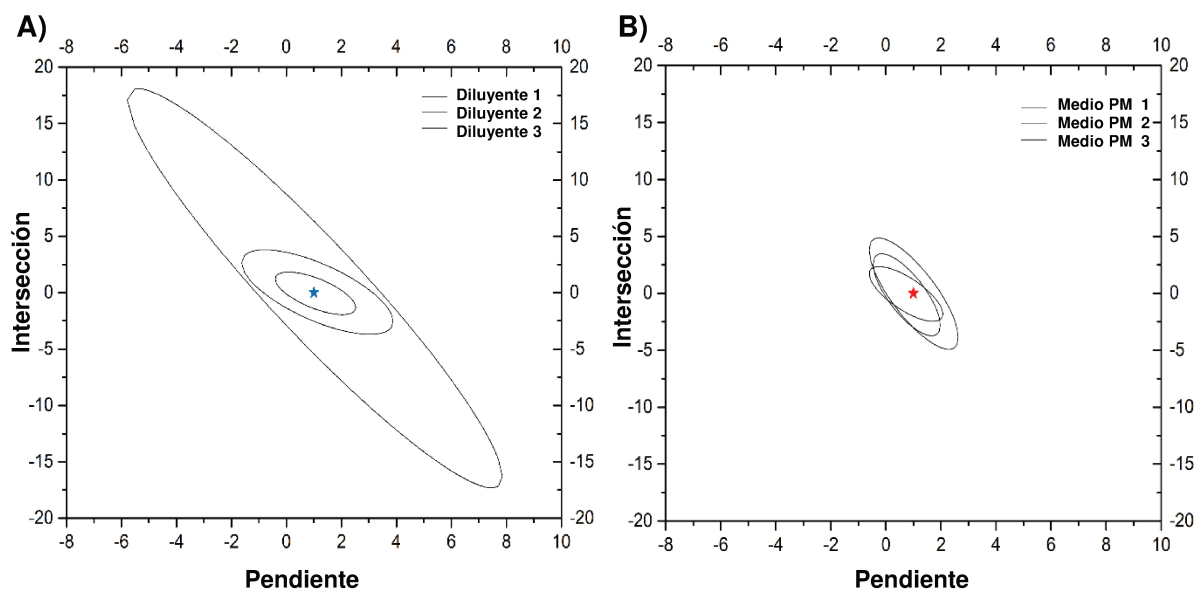


Figura 30: Test EJCR aplicado al ELISA de competición para mGMOP₃-IFN-mGMOP en A) solución diluyente y B) medio de cultivo PM. Cada condición se analizó por triplicado. En ambos casos, el punto ideal (1,0) se ubica dentro de cada elipse, confirmando la exactitud del método.

Además, se realizó una prueba de paralelismo para confirmar la ausencia de efectos de matriz. El análisis estadístico indicó que las curvas estándar y las obtenidas con el analito en solución de dilución y en medio PM eran paralelas, con valores de p de 0,7241 y 0,6307, respectivamente, lo que respalda la validez del método en ambas matrices.

La puesta a punto de un ensayo de cuantificación requiere necesariamente la estimación de su precisión o reproducibilidad. La evaluación de estos parámetros demanda el análisis de mediciones reiteradas de diferentes muestras del analito, tanto dentro del mismo ensayo (coeficiente de variación intraensayo) como en ensayos reproducidos en diferentes ocasiones (coeficiente de variación interensayo). Con este fin, la precisión del ELISA de competición se analizó en tres niveles de concentración de mGMOP₃-IFN-mGMOP (5, 2,5 y 0,625 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Cada muestra se procesó por triplicado dentro de cada ensayo, realizándose tres experimentos independientes (Tabla 12).

Los valores obtenidos demuestran altos niveles de repetibilidad y precisión en ambas matrices, en concordancia con los valores reportados en la literatura (Wang y col., 2023). En ambos casos, se determinó un rango lineal de 0,3125 a 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tabla 12: Evaluación de la precisión del ELISA de competición para la cuantificación de mGMOP₃-IFN-mGMOP

	mGMOP ₃ -IFN-mGMOP		
	Concentración ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CV% intraensayo	CV% interensayo
Solución diluyente	5	2	3
	2,5	4	6
	0,625	6	13
Medio de cultivo PM (1:2)	5	4	14
	2,5	6	9
	0,625	8	17

1.3.2. Desarrollo de un método de detección: *western blot*

El sistema mGMOP-mAb CC1H7 fue finalmente evaluado como herramienta de detección. Para ello, se analizó la capacidad del mAb CC1H7 para reconocer las etiquetas en el contexto de las proteínas de fusión desnaturalizadas, mediante un ensayo de SDS-PAGE seguido de *western blot*. Las variantes mGMOP-IFN y mGMOP₃-IFN-mGMOP fueron reconocidas tanto por el mAb CC1H7 como por el pAb anti-IFN de conejo, exhibiendo masas moleculares aparentes aproximadas de 30 y 40 kDa, respectivamente. El mAb detectó un mayor número de isoformas en comparación con el pAb, lo que indica una mayor sensibilidad por las proteínas etiquetadas (Fig. 31).

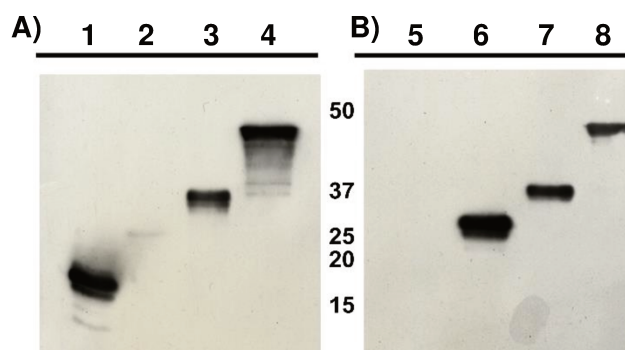


Figura 31: Evaluación de la capacidad del mAb CC1H7 como herramienta de detección. SDS-PAGE seguido de *western blot*. Detección mediante el empleo de **A)** mAb CC1H7 y **B)** pAb anti-IFN. **Calles: 1 y 5-** rhGM-CSF; **2 y 6-** IFN-NG; **3 y 7-** mGMOP-IFN; **4 y 8-** mGMOP₃-IFN-mGMOP.

Este comportamiento podría deberse a que el pAb anti-IFN fue generado utilizando como antígeno el IFN-NG producido en *E. coli*, lo que podría limitar el reconocimiento de epitopes parcial o totalmente enmascarados por O-glicanos en determinadas isoformas. En cambio, el mAb CC1H7 se une al extremo N de la proteína, que constituye una región más accesible, permitiendo una unión eficiente independientemente de la decoración glicosídica.

Como era de esperar, el mAb CC1H7 reconoció exitosamente el epítopo APAR presente en el rhGM-CSF (del cual deriva el péptido mGMOP) o presente en las moléculas de IFN que fueron etiquetadas. Por el contrario, el pAb detectó al IFN-NG y a las variantes de fusión (que contienen rhIFN), lo que confirma la especificidad del sistema y la ausencia de reactividad cruzada. La determinación del LOD y el LOQ se realizó mediante la incubación de distintas diluciones de ambas muestras (Fig. 32).

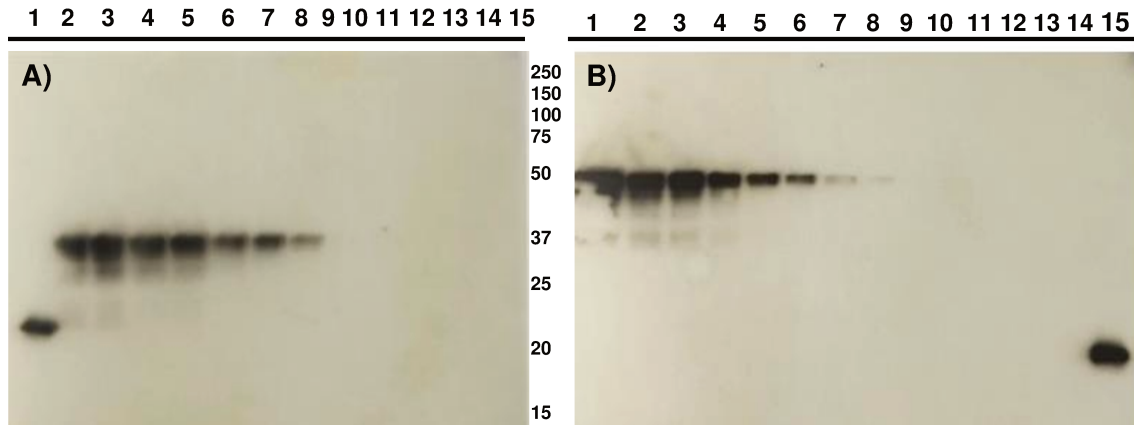


Figura 32: Determinación del LOD utilizando el mAb CC1H7 como herramienta de detección de proteínas etiquetadas con una copia (A) y cuatro copias (B) del péptido mGMOP. A) Calles: 1- rhGM-CSF (control); 2 a 12- Diluciones de mGMOP-IFN; 13 a 15- Blancos de reactivos. B) Calles: 1 a 11- Diluciones de mGMOP₃-IFN-mGMOP; 12 a 14- Blancos de reactivos; 15- rhGM-CSF (control).

Los valores obtenidos fueron: para mGMOP-IFN, 8 ng (LOD) y 15 ng (LOQ) y para mGMOP₃-IFN-mGMOP, 10 ng (LOD) y 19 ng (LOQ).

En resumen, el mAb CC1H7 demostró ser una herramienta efectiva para la detección de proteínas de fusionadas al péptido mGMOP, reconociendo el epítopo APAR tanto en su contexto nativo como integrado en proteínas con una o más copias del péptido. Además, su utilidad podría extenderse a otras metodologías inmunoquímicas o técnicas que aprovechen esta interacción específica. Cabe destacar que un mayor contenido de copias de mGMOP no genera una mayor detectabilidad porque el mAb reconoce al péptido APAR en posición N-terminal, es decir, cuando el grupo amino de Ala se encuentra libre (Oggero y col., 2004)

2. ESTUDIO DE LAS ETIQUETAS GMOP Y mGMOP FUSIONADAS A hIFN EN CONDICIONES DE HIPER-O-GLICOSILACIÓN

Como se mencionó previamente, estudios realizados en el laboratorio demostraron que la fusión de un solo péptido GMOP o mGMOP al hIFN genera un aumento de la masa molecular debido a la incorporación de O-glicanos. Esta modificación impacta tanto en la actividad biológica como en las propiedades farmacocinéticas de la proteína fusionada respecto de la especie wt. Si bien las variantes GMOP-IFN y mGMOP-IFN conservaron la AAV en comparación con el IFN-wt, su AAP se vio comprometida, alcanzando aproximadamente el 70% y el 23% de la reportada para IFN-wt, respectivamente. Por otro lado, ambas variantes mostraron mejoras significativas en sus perfiles farmacocinéticos con incrementos de 3,3 y 2,8 veces en el tiempo de vida media de eliminación y una disminución en el *clearance* aparente de 3,7 y 4,1 veces, respectivamente. Sin embargo, las diferencias observadas en los parámetros de las variantes fusionadas a los distintos péptidos no resultaron estadísticamente significativas.

A partir de estos resultados, se planteó profundizar el análisis del efecto del tipo y proporción péptido/proteína sobre las propiedades del hIFN. En particular, se propuso evaluar la fusión de múltiples copias de GMOP y mGMOP a la misma proteína, con el objetivo de inducir condiciones de hiper-O-glicosilación y analizar su impacto sobre la actividad biológica y el comportamiento farmacocinético. En este contexto, se espera determinar si el aumento en el número de copias modifica de manera diferencial la actividad biológica *in vitro*, provocando una disminución más marcada en la molécula que contiene el péptido mGMOP que en la que porta el GMOP. Asimismo, se evaluará si el incremento en la glicosilación permite obtener una mejora farmacocinética en las proteínas de fusión que contienen mGMOP, en comparación con GMOP. Para abordar estos interrogantes, se construyeron variantes de hIFN fusionadas a múltiples copias de GMOP y mGMOP, con el fin de estudiar su efecto sobre la actividad biológica y farmacocinética en condiciones de hiper-O-glicosilación.

2.1. Generación de muteínas de fusión hiper-O-glicosiladas de hIFN

2.1.1. Diseño de las variantes y análisis *in silico* de los sitios potenciales de O-glicosilación

Como se mencionó en la sección 6.1 del apartado Introducción, en nuestro laboratorio se evaluó previamente la fusión de diferentes números de copias del péptido mGMOP al hIFN, tanto en posición N como C-terminal, obteniéndose los mejores resultados en términos de grado de glicosilación y farmacocinética mediante la incorporación de 4 copias de la etiqueta: 3 en el extremo N y 1 en el extremo C (Iturraspe y col., 2019). Por este motivo, con el fin de comparar el desempeño de las etiquetas GMOP y mGMOP, se diseñaron dos variantes

hiper-O-glicosiladas: GMOP₃-IFN-GMOP y mGMOP₃-IFN-mGMOP. Cabe destacar la necesidad de fusionar al menos una copia del péptido en el extremo N de la citoquina, de modo que el primer residuo de Ala del epítopo APAR quede libre para interactuar con el mAb CC1H7 (Oggero y col., 2004), permitiendo el uso de este sistema inmunoquímico en las técnicas desarrolladas en la sección 1 de RyD.

El análisis de las secuencias mediante el programa SignalP 4.1 Server demostró que la fusión de las etiquetas a la región N-terminal del hIFN afecta la secuencia de reconocimiento de clivaje del péptido señal de la citoquina. Por lo tanto, para asegurar la correcta secreción de las variantes al sobrenadante de cultivo, dicha señal fue reemplazada por la secuencia de señalización del hGM-CSF.

La incorporación de sitios de restricción entre las etiquetas se realizó oportunamente en la variante mGMOP₃-IFN-mGMOP como estrategia para obtener moléculas con un número variable de copias del péptido, mediante digestión, religación y clonado. Como consecuencia, se adicionaron dos aminoácidos entre los péptidos (Pro y Gly o Gly y Thr), codificados por las secuencias de las enzimas de restricción seleccionadas (SmaI y KpnI, respectivamente) teniendo en cuenta varios factores, entre ellos su influencia sobre la probabilidad de O-glicosilación (Iturraspe y col., 2019). Para facilitar la comparación, la molécula GMOP₃-IFN-GMOP se diseñó de manera similar (Fig. 33).

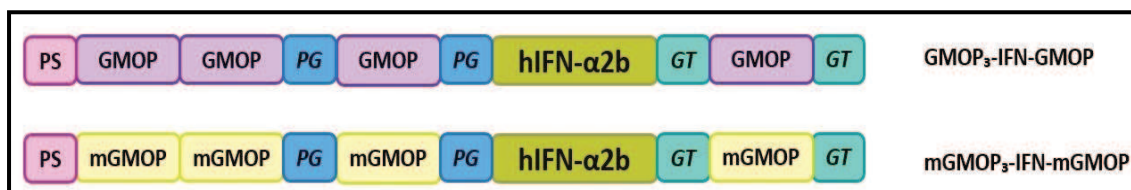


Figura 33: Variantes O-glicosiladas de hIFN conteniendo unidades repetidas de cada péptido. Se muestra el diseño de la molécula para cada variante, cuya nomenclatura se indica a la derecha. Ambas moléculas contienen el péptido señal del hGM-CSF, coloreado en rosado; PG corresponde a Prolina-Glicina (sitio SmaI) y GT a Glicina-Treonina (sitio KpnI).

Posteriormente, se llevaron a cabo análisis *in silico* para evaluar de manera teórica la probabilidad de O-glicosilación de las nuevas moléculas diseñadas, empleando diferentes programas bioinformáticos. El servidor NetOGly 4.0 permite predecir sitios de adición de O-glicanos teniendo en cuenta el contexto de la secuencia y la accesibilidad superficial, identificando correctamente el 76% de los sitios glicosilados y el 93% de los no glicosilados (Li y col., 2006). Utiliza datos de entrenamiento basados en sitios de glicosilación previamente encontrados en proteínas estudiadas. Por otro lado, ISOGlyP tiene una precisión de predicción general del 70 % en comparación con datos *in vivo*, similar a la de NetOGlyc 4.0. Además, puede identificar los efectos que tiene la glicosilación previa en sitios cercanos (corto alcance) o más distantes (largo alcance) dentro de la proteína (Mazuca y Mohl, 2024) y predecir qué isoforma de GalNAc-transferasa es probablemente responsable de glicosilar cada sitio,

utilizando datos derivados de péptidos aleatorios específicos de cada transferasa (Mohl y col., 2020).

Mediante estos análisis se estimó entre 16 y 20 sitios glicosilables para GMOP₃-IFN-GMOP y entre 24 y 28 para mGMOP₃-IFN-mGMOP, de acuerdo con el programa empleado. La identidad del aminoácido, la posición del sitio y el puntaje obtenido por cada *software* se detallan en las Tablas 13 y 14. El valor proporcionado por NetOGlyc 4.0 (*“score”*) representa la probabilidad de glicosilación, considerando un umbral de ~0.5: valores superiores indican sitios positivos para O-glicosilación. Por su parte, ISOGlyP reporta valores EVP (del inglés *enhancement value product*), donde un EVP<1 sugiere baja probabilidad de O-glicosilación y un EVP>1 indica alta probabilidad, reflejando la preferencia de las transferasas por cada sitio.

Tabla 13: Predicción *in silico* de sitios potenciales de O-glicosilación de la variante GMOP₃-IFN-GMOP. Utilización de programas especializados

			NetOGlyc 4.0	ISOGlyP EVP
GMOP₃-IFN-GMOP	Ser	5		1,35
	Ser	7	0,963834	1,40
	Ser	9	0,986331	4,20
	Thr	10	0,927391	2,42
	Ser	19	0,983754	1,35
	Ser	21	0,935551	1,40
	Ser	23	0,980892	4,20
	Thr	24	0,843935	2,42
	Ser	35	0,961049	1,35
	Ser	37	0,872268	1,40
	Ser	39	0,934768	4,20
	Thr	40	0,642741	2,42
	Thr	98		2,22
	Thr	152		7,23
	Thr	213	0,607014	1,59
	Ser	218	0,956131	1,35
	Ser	220	0,817546	1,40
	Ser	222	0,887261	4,20
	Thr	223	0,685935	2,42
	Thr	229		1,56
TOTAL			16	20

Tabla 14: Predicción in silico de sitios potenciales de O-glicosilación de la variante mGMOP₃-IFN-mGMOP. Utilización de programas especializados

			NetOGlyc 4.0	ISOGlyP EVP
mGMOP₃-IFN-mGMOP	Ser	5	0,99523	1,35
	Ser	7	0,98865	3,03
	Thr	9	0,99085	56,72
	Thr	11	0,99189	52,04
	Thr	13	0,98196	18,14
	Thr	15	0,97804	10,59
	Ser	20	0,98495	1,35
	Ser	22	0,94193	3,03
	Thr	24	0,85475	56,72
	Thr	26	0,79503	52,04
	Thr	28	0,708455	52,04
	Thr	30	0,65274	29,21
	Ser	37	0,83678	1,35
	Ser	39	0,70249	3,03
	Thr	41	0,60537	56,72
	Thr	43	0,5000	52,04
	Thr	45		52,04
	Thr	47	0,50635	29,50
	Thr	101		2,22
	Thr	155		7,23
	Thr	216	0,61904	1,59
	Ser	221	0,98703	1,35
	Ser	223	0,95504	3,03
	Thr	225	0,96308	56,72
Thr	227	0,95009	52,04	
Thr	229	0,86871	20,52	
Thr	231	0,60171	5,71	
Thr	233		1,90	
TOTAL			24	28

Los resultados indican que la variante mGMOP₃-IFN-mGMOP exhibe 8 sitios probables de O-glicosilación más que la variante GMOP₃-IFN-GMOP, lo cual es consistente con el hecho de que mGMOP aporta dos sitios potenciales adicionales en comparación con GMOP. Es probable que el incremento en la probabilidad de O-glicosilación esté relacionado con el entorno enriquecido en Pro introducido por la etiqueta peptídica fusionada. El análisis con NetOGlyc 4.0 predice sitios de O-glicosilación principalmente en las etiquetas añadidas, así como un sitio

generado por los aminoácidos codificados por las secuencias de las enzimas de restricción en la Thr216; sin embargo, no detecta la glicosilación natural del residuo Thr106 del IFN-wt en ninguna de las variantes analizadas. En contraste, el análisis mediante ISOglyP no solo predice los sitios asociados a las etiquetas peptídicas y al sitio de restricción en la Thr216, sino que también identifica dos sitios adicionales de glicosilación en regiones internas de la molécula. Uno de estos sitios corresponde al residuo Thr106 glicosilado naturalmente en el hIFN- α 2b nativo, representado en la Thr152 en GMOP₃-IFN-GMOP y en la Thr155 en mGMOP₃-IFN-mGMOP. El otro sitio se observa en la Thr98 y en la Th101 respectivamente, en una parte de la secuencia del hIFN que naturalmente no se encuentra glicosilada. Esto puede deberse a la influencia de los péptidos, pudiendo alterar el contexto local y la conformación predicha o bien por especificidades enzimáticas consideradas por el algoritmo, en particular a la inclusión de por ejemplo, la GalNAc-transferasa 7 para la cual no hay evidencia científica hasta el momento de su presencia o ausencia en células CHO. Esto refleja las diferencias entre los algoritmos utilizados por cada programa.

2.1.2. Desarrollo de líneas celulares productoras de las variantes de rhIFN

Con el objetivo de obtener líneas celulares estables productoras de GMOP₃-IFN-GMOP y mGMOP₃-IFN-mGMOP, se construyeron vectores lentivirales de tercera generación como herramienta de transferencia de material genético. Para tal fin, fue necesario como primer paso clonar las secuencias codificantes de cada una de las variantes en los correspondientes vectores lentivirales de transferencia, para luego llevar a cabo el ensamblado de las partículas lentivirales y la posterior transducción.

2.1.2.1. Construcción de vectores de expresión para células eucariotas

Los vectores pUC57 y pMA-T fueron digeridos con las enzimas de restricción XbaI y Sall para obtener la secuencia codificante de las variantes GMOP₃-IFN-GMOP (773 pb) y mGMOP₃-IFN-mGMOP (801 pb), respectivamente, verificándose la liberación de los fragmentos de interés. En paralelo, se digirió el vector pLV-PLK con las mismas enzimas, se purificó mediante precipitación con etanol absoluto y se analizó su integridad en un gel de agarosa. Luego de determinar su concentración, se llevó a cabo una reacción de ligación entre el inserto y el vector, realizándose un control de VR (sólo vector digerido). Se transformaron células *E. coli* TOP10 competentes con el producto de ligación y el control VR. La presencia del inserto en las colonias transformadas se evaluó mediante minipreparación de ADN plasmídico, digestión con las enzimas XbaI y Sall y electroforesis en gel de agarosa. Para ambas construcciones, se observó la liberación de fragmentos de aproximadamente 800 pb (correspondiente a cada inserto) y 7000 pb (correspondiente al vector) en los clones positivos. La secuenciación de ADN de los clones seleccionados confirmó la identidad de las secuencias

diseñadas y la ausencia de mutaciones indeseadas durante el proceso de clonado. Los clones positivos fueron criopreservados, realizándose una maxipreparación de ADN plasmídico a partir de un clon correspondiente a cada construcción para su uso posterior.

De este modo, se clonaron exitosamente las secuencias sintéticas codificantes de GMOP₃-IFN-GMOP y mGMOP₃-IFN-mGMOP en el vector de transferencia del sistema lentiviral.

2.1.2.2. Producción de vectores lentivirales

Debido a su integración genómica estable y elevada eficiencia de transducción, los vectores lentivirales representan una alternativa robusta y reproducible para el desarrollo de líneas celulares productoras de proteínas recombinantes de interés terapéutico (Shearer y Saunders, 2015). Con este propósito, se ensamblaron vectores lentivirales de tercera generación portadores de las variantes de rhIFN, así como también un vector control codificante de GFP. Para ello, se cotransfectaron células HEK 293T/17 con los plásmidos de transferencia contruidos previamente (sección 2.1.2.1 de RyD) y los plásmidos empaquetadores, siguiendo la metodología descrita en la sección 5.8.2 de MyM. A partir de las partículas lentivirales GFP ensambladas en paralelo, se determinó un título de $1,2 \times 10^7$ UT.ml⁻¹, valor consistente con lo reportado en la literatura (Geraerts y col., 2006; Perry y Rayat, 2021), lo que confirmó un proceso de ensamblado exitoso.

2.1.2.3. Generación de líneas celulares

Las partículas lentivirales generadas en la etapa anterior se utilizaron para transducir células sCHO, con el fin de generar líneas celulares productoras de las variantes de interés, siguiendo el protocolo detallado en la sección 5.8.4 de MyM. Se realizaron cuatro rondas sucesivas de transducción empleando los vectores lentivirales específicos para cada proteína de interés, junto con el vector control pLV-pLK-GFP. El objetivo de las transducciones reiteradas fue maximizar la incorporación de copias del transgén en el genoma celular, favoreciendo así una expresión estable y sostenida. Esta estrategia se fundamenta en resultados previos del laboratorio, donde la retransducción de líneas previamente modificadas aumentó la productividad hasta 2,6 veces (Villaraza y col., 2021).

La eficiencia de cada evento de transducción se evaluó a partir de la expresión de GFP, lo que permitió inferir la proporción de células transducidas. De esta manera, mediante microscopía de fluorescencia se observaron altos niveles de células transducidas (Fig. 34); mientras que por citometría de flujo se confirmó este resultado, con porcentajes de células verdes fluorescentes entre 95 y 98% luego de cada etapa de transducción.

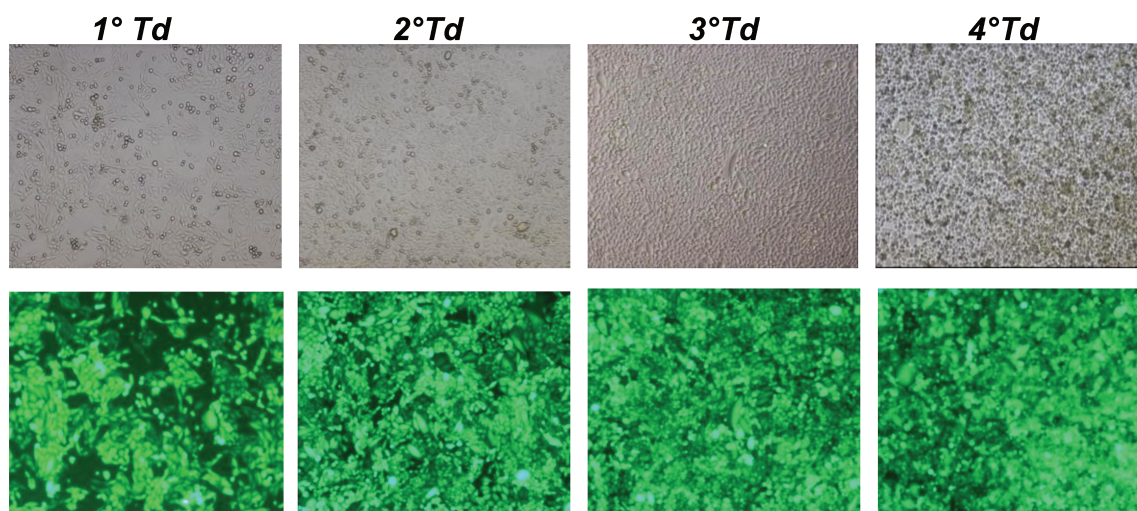


Figura 34: Microscopía de campo claro y fluorescencia de las transducciones (1° a 4° Td) de células sCHO con el vector lentiviral pLV-pLK-GFP. En el panel superior se observa el número total de células, mientras que en el panel inferior se observan las células verdes que incorporaron el transgén que codifica para la proteína GFP. Td: transducción.

A su vez, se evaluó la productividad de las líneas sCHO-GMOP₃-IFN-GMOP y sCHO-mGMOP₃-IFN-mGMOP luego de cada etapa de transducción, siguiendo la metodología descrita en la sección 5.8.7 del apartado MyM.

Para ambas líneas celulares, se observó un aumento progresivo de la productividad con cada ronda sucesiva de transducción (Fig. 35). No obstante, para la línea sCHO-GMOP₃-IFN-GMOP, el incremento con respecto a la primera transducción solo resultó estadísticamente significativo luego de la cuarta ronda, observándose una productividad 2,5 veces superior ($753 \pm 170 \text{ ng} \cdot 10^6 \cdot \text{cél}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ versus $302 \pm 77 \text{ ng} \cdot 10^6 \cdot \text{cél}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$). Por otro lado, para la línea sCHO-mGMOP₃-IFN-mGMOP, se observaron diferencias significativas en la productividad desde las primeras retransducciones. Dado que la productividad inicial fue muy baja ($10 \text{ ng} \cdot 10^6 \cdot \text{cél}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$), se alcanzó un valor 55 veces superior luego de la cuarta transducción, con un máximo de $556 \pm 111 \text{ ng} \cdot 10^6 \cdot \text{cél}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$. Estos resultados sugieren que el comportamiento frente a rondas sucesivas de transducción puede variar considerablemente según la construcción genética, la proteína de interés y las regiones del genoma donde se insertaron las copias del gen. No obstante, los valores de productividad obtenidos se encuentran dentro del rango reportado en el laboratorio para líneas celulares en etapas iniciales de desarrollo (Sales y col., 2021; Villaraza y col., 2021). Por esta razón, y dado que se avanzó hacia la etapa de selección, no se realizaron nuevas rondas de transducción.

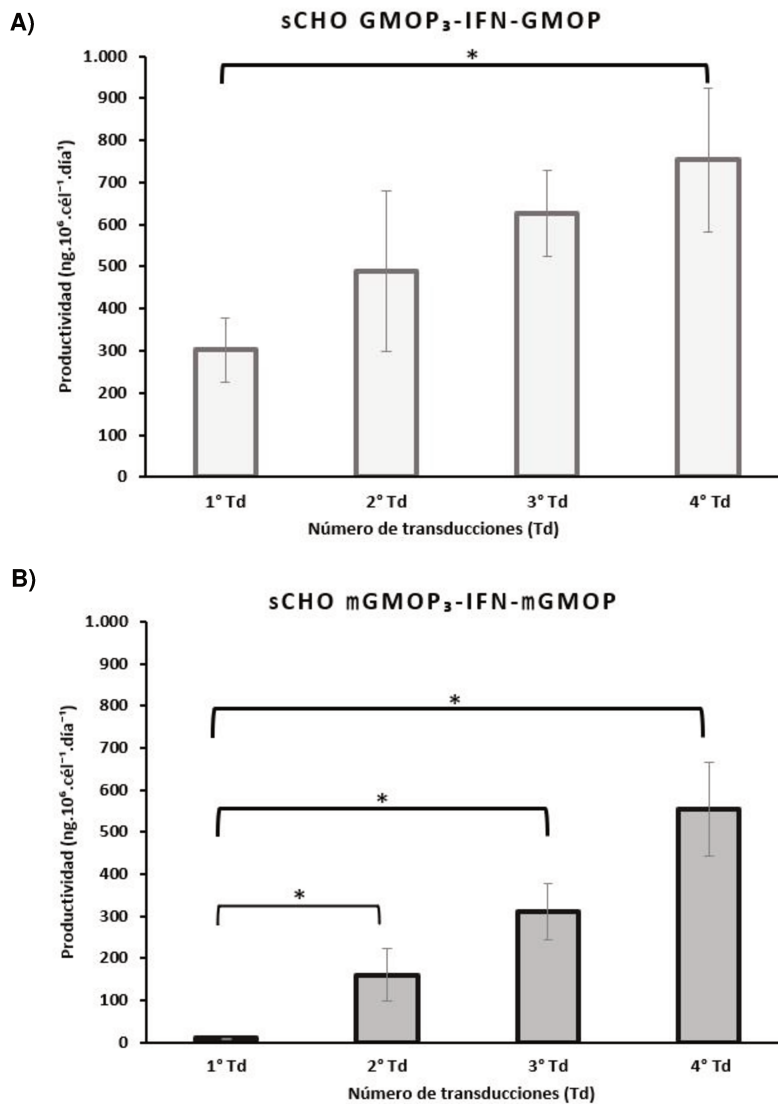


Figura 35: Productividad de las líneas celulares productoras: A) sCHO GMOP₃-IFN-GMOP y B) sCHO mGMOP₃-IFN-mGMOP, tras cada ronda de transducción. Se muestra el promedio de los resultados obtenidos en cuatro ensayos independientes \pm SD. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas: * ($p < 0,05$).

2.1.2.4. Selección de líneas celulares productoras

Con el fin de obtener un cultivo con mayor proporción de células que presentan una mayor expresión de las proteínas de interés, se llevó a cabo un proceso de presión selectiva mediante concentraciones crecientes de puromicina, dado que los vectores utilizados contienen un gen de resistencia a este antibiótico. Este tratamiento permite eliminar las células que no expresan activamente el gen de resistencia, asegurando así una población enriquecida y estable. Además, la selección es clave para mantener la expresión del transgén a lo largo del tiempo, evitando su pérdida por silenciamiento epigenético o por dilución durante la proliferación celular. Para llevar a cabo la selección, en una primera etapa las líneas celulares transducidas cuatro veces se expusieron a concentraciones paralelas de puromicina desde $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Este procedimiento se realizó con el fin de identificar condiciones capaces de

discriminar células con mayor expresión del gen de resistencia. Ninguna de estas concentraciones provocó una caída drástica de la viabilidad celular. En cuanto a la productividad, la línea sCHO-GMOP₃-IFN-GMOP alcanzó un valor máximo de $\sim 4,1 \mu\text{g} \cdot 10^6 \cdot \text{cél}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ con $60 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de puromicina; mientras que la línea sCHO-mGMOP₃-IFN-mGMOP presentó una productividad máxima de $\sim 2,9 \mu\text{g} \cdot 10^6 \cdot \text{cél}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ con $90 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de puromicina (Fig. 36).

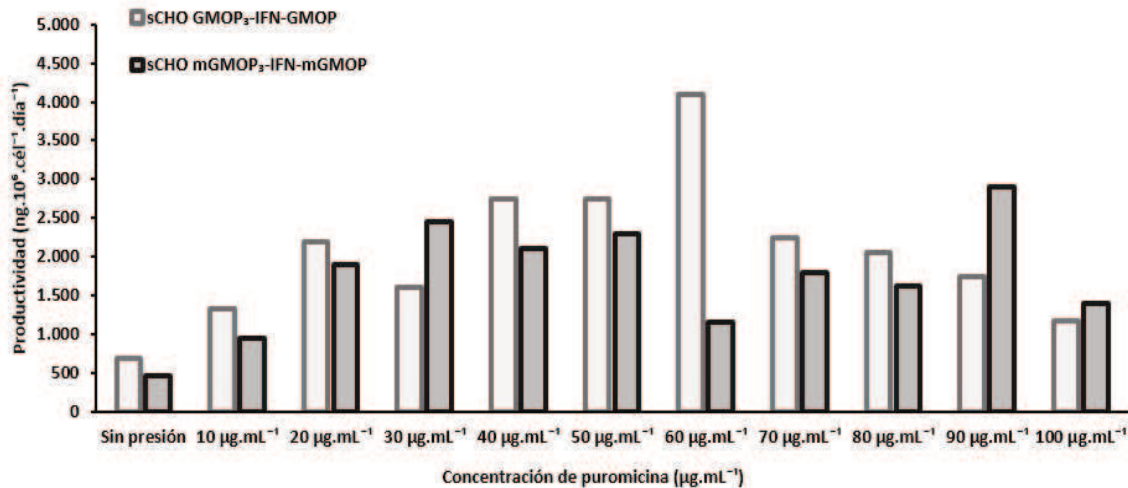


Figura 36: Primera etapa de presión selectiva. Productividad de las líneas transducidas luego de la exposición a distintas concentraciones de puromicina.

En una segunda etapa, la presión con puromicina se continuó sobre las líneas previamente seleccionadas, incrementándose progresivamente hasta $240 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Si bien ambas líneas toleraron concentraciones elevadas del antibiótico, la productividad máxima se alcanzó a diferentes niveles de presión (Figura 37).

Para la línea sCHO-GMOP₃-IFN-GMOP, la productividad aumentó con la concentración de puromicina, alcanzando un valor máximo de $\sim 6 \mu\text{g} \cdot 10^6 \cdot \text{cél}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ a $240 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. No se continuó la presión, ya que a partir de $160 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ los aumentos en productividad tendieron a estabilizarse, por lo que no se justificaba la exposición a concentraciones más elevadas de puromicina. Para la línea sCHO-mGMOP₃-IFN-mGMOP, la máxima productividad fue de $\sim 4,8 \mu\text{g} \cdot 10^6 \cdot \text{cél}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ a $160 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de puromicina, comenzando a decrecer a partir de esta concentración.

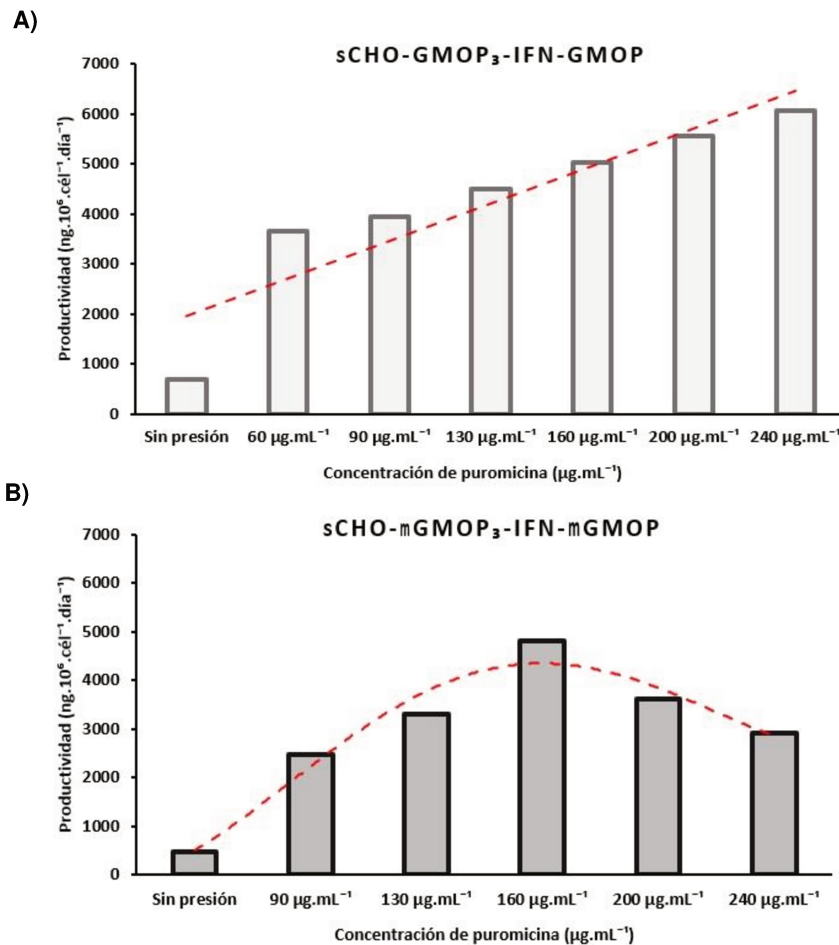


Figura 37: Segunda etapa de presión selectiva. Productividad de las líneas: **A)** sCHO GMOP₃-IFN-GMOP (60) y **B)** sCHO mGMOP₃-IFN-mGMOP (90), seleccionadas de la primera etapa de presión, luego de la exposición a concentraciones crecientes de puromicina.

De estos resultados se desprende que, una vez finalizados los procesos de transducción y selección, la productividad de la línea sCHO-GMOP₃-IFN-GMOP aumentó 20 veces en comparación con la línea obtenida tras la primera transducción. De manera similar, la línea sCHO-mGMOP₃-IFN-mGMOP mostró un incremento de 55 veces respecto a la línea resultante de la primera transducción. Aunque la productividad varía según el tipo de proteína expresada, los valores obtenidos en este trabajo resultan mayores a los reportados en protocolos que emplean una única transducción y una sola etapa de presión gradual para producir variantes de rhIFN modificado (Gugliotta y col., 2013; Sales y col., 2021). Asimismo, estos valores se sitúan en rango dentro de lo reportado en la literatura para células CHO que expresan interferones tipo I y tipo III, sin recurrir a la selección clonal (Ceaglio y col., 2016; Yuan y col., 2017). Estos resultados indican un sistema de expresión eficiente de estas citoquinas, que suelen secretarse en bajas cantidades, y constituyen una base sólida para futuros procesos de optimización.

En consecuencia, se consideró que los niveles de productividad alcanzados eran adecuados para avanzar hacia la etapa de adaptación a suspensión, en la cual suele observarse una disminución en los niveles de expresión.

2.1.2.5. Adaptación al crecimiento en suspensión

Las líneas sCHO productoras de GMOP₃-IFN-GMOP y mGMOP₃-IFN-mGMOP fueron cultivadas inicialmente en medio DMEM HAM's F12 suplementado con SFB 5% (v/v), debido a su elevado contenido de nutrientes y componentes esenciales que favorecen la proliferación celular. Sin embargo, su composición indefinida representa una fuente significativa de variabilidad experimental, limita la reproducibilidad, dificulta los procesos de purificación y aumenta el riesgo de contaminación. Además, su uso incrementa los costos y plantea consideraciones éticas relacionadas con su obtención. Estos aspectos han impulsado su reemplazo y la búsqueda de medios de cultivo libres de suero, de hecho, las agencias regulatorias recomiendan fuertemente su reemplazo en la formulación de los medios de cultivo destinados a la producción de biofármacos (Van der Valk y col., 2018; Yao y Asayama, 2017). Existe una relación directa entre el medio de cultivo utilizado y la producción de proteínas recombinantes, ya que a través de su selección y optimización pueden mejorarse los niveles de expresión, el crecimiento y la viabilidad celular de forma rentable y eficiente (McGillicuddy y col., 2018). En este contexto, las líneas sCHO recombinantes fueron sometidas a un proceso de adaptación al crecimiento en suspensión, en medio sin suero y en agitación.

En una primera instancia, se llevó a cabo la adaptación al medio EX-CELL® 302, rico en nutrientes y formulado con proteínas humanas recombinantes de bajo peso molecular (sección 5.8.6 de MyM). Este medio fue desarrollado específicamente para el crecimiento a largo plazo de células CHO adaptadas a suspensión, destinadas a la producción de anticuerpos u otras proteínas bioterapéuticas. Sin embargo, contiene otros componentes de origen animal como colesterol o lípidos que dificulta los procesos de purificación posteriores.

Posteriormente, debido a la necesidad de reducir los costos asociados al uso de EX-CELL® 302, especialmente en etapas de producción que requieren grandes volúmenes, y apuntando a mejorar el *downstream* se inició la segunda etapa de adaptación hacia el medio CD BHK PM (sección 5.8.6 de MyM). El medio PM es libre de suero, químicamente definido y libre no solo de proteínas sino de todo componente de origen animal (*animal-origin-free* o AOF). Fue originalmente diseñado para la producción de vacunas virales en cultivos de células BHK-21, aunque ha demostrado un excelente desempeño con otras líneas celulares. Posee múltiples aplicaciones en la producción a gran escala, permitiendo alcanzar altas densidades celulares con elevada viabilidad. En particular, en nuestro laboratorio, su eficacia ha sido validada con líneas CHO recombinantes, observándose una fase lag mínima, un inicio de fase exponencial a las 24 h, tiempos de duplicación menores a 24 h, altas densidades celulares,

elevada viabilidad y niveles de producción celular específica comparables a los obtenidos con EX-CELL® 302 (Lottersberger y col., 2022).

Una vez finalizada la adaptación a medio 100% PM, se evaluó la productividad, obteniéndose un valor de $\sim 7 \mu\text{g} \cdot 10^6 \cdot \text{cél}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ para la línea sCHO-GMOP₃-IFN-GMOP y de $\sim 4,9 \mu\text{g} \cdot 10^6 \cdot \text{cél}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ para la línea sCHO-mGMOP₃-IFN-mGMOP. Estos resultados indican una exitosa adaptación al crecimiento en suspensión en medio libre de suero, ya que las productividades se mantuvieron o incluso superaron las obtenidas luego del proceso de presión de selección en adherencia, alcanzándose valores adecuados para avanzar hacia la fase de producción de las proteínas de interés.

Este comportamiento es particularmente relevante, dado que la transición a condiciones de cultivo más restrictivas suele asociarse a una disminución en la expresión del transgén, lo que resalta la estabilidad y robustez de ambas líneas celulares.

2.1.2.6. Producción de las variantes de interés

La producción de las variantes O-glicosiladas del rhIFN se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en la sección 5.8.8 de MyM. Se realizaron 12 cosechas, obteniéndose concentraciones que oscilaron entre 5 y 13 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ en ambos casos. La masa total obtenida de la variante GMOP₃-IFN-GMOP fue de aproximadamente 11 mg, mientras que se obtuvieron alrededor de 13 mg de la variante mGMOP₃-IFN-mGMOP.

2.2. Purificación de las variantes de interés mediante CIA

2.2.1. Purificación por CIA con mAb CC1H7

Para extender la aplicabilidad del sistema de afinidad epítopo APAR-mAb CC1H7, se evaluó su desempeño en la purificación de la variante GMOP₃-IFN-GMOP. Este sistema resultó un método simple y de un solo paso para la purificación de proteínas etiquetadas con una o más copias del péptido mGMOP (mGMOP-IFN y mGMOP₃-IFN-mGMOP, sección 1.2.4 de RyD), alcanzando altos niveles de recuperación y pureza. Por este motivo, se analizó su utilidad para la purificación de la variante hiperglicosilada que incluye al otro péptido de interés, GMOP, donde el epítopo se encuentra en un contexto aminoacídico y de O-glicanos diferente. Asimismo, se estudió el impacto del agregado de sal sobre el proceso de purificación, siguiendo el mismo enfoque aplicado previamente para las variantes con mGMOP. Para ello, utilizando 6 mL de resina mAb CC1H7-*Sepharose*, se realizaron dos ensayos independientes: uno con sobrenadante de cultivo sin adición de sal y otro con sobrenadante acondicionado con Na₂SO₄ 1 M, siguiendo esencialmente el protocolo descrito en la sección 7.1.4 de MyM. Los cromatogramas obtenidos se muestran en la Fig. 38.

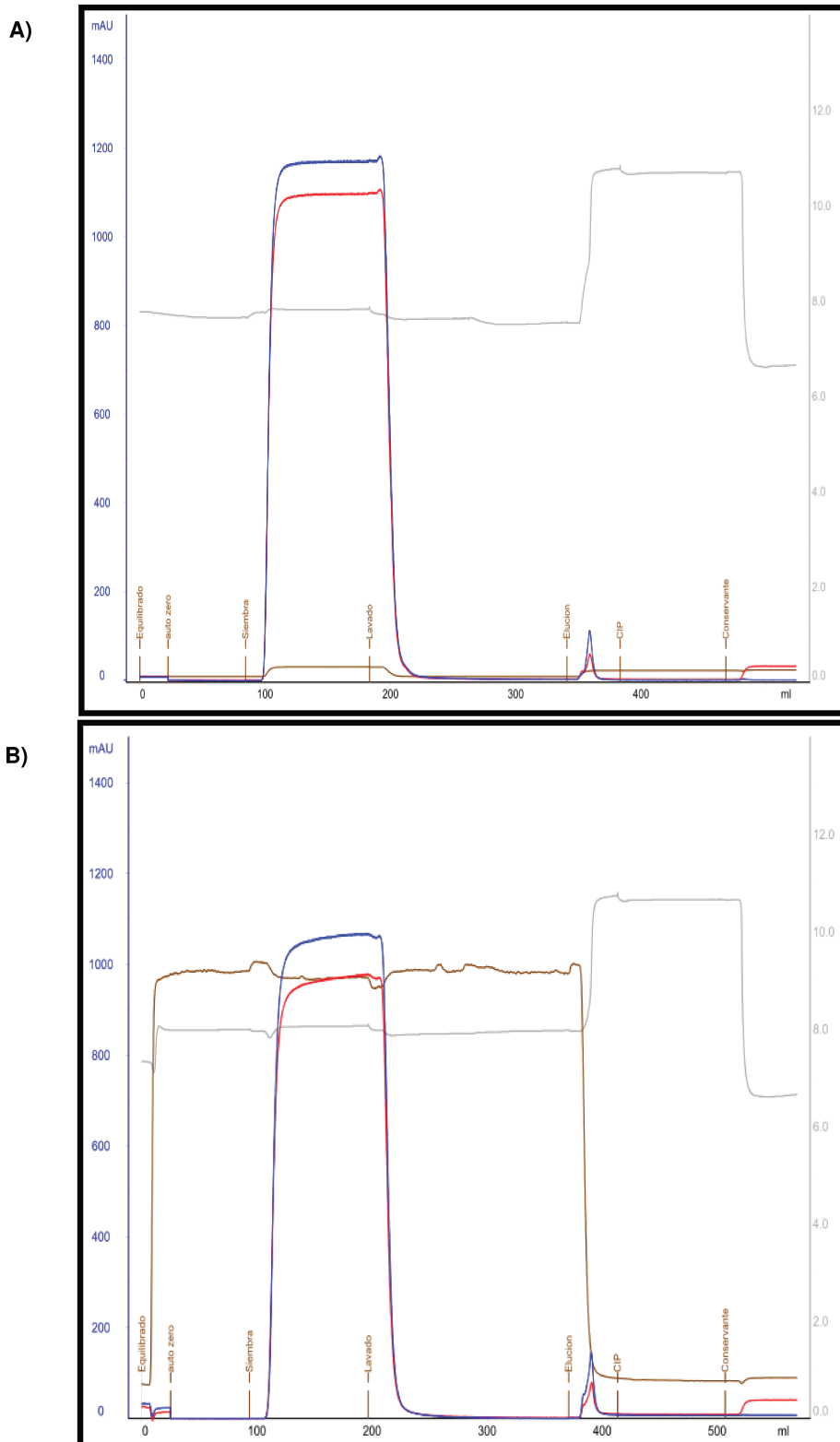


Figura 38: Purificación de GMOP₃-IFN-GMOP por CIA empleando la matriz mAb CC1H7-*Sepharose* en presencia (A) y ausencia (B) de Na₂SO₄ 1M. En el cromatograma se representan las señales de absorbancia a $\lambda = 280$ nm (azul), conductividad (marrón) y pH (gris) en función del volumen de elución. Se indica, además, el inicio de las etapas de equilibrado, siembra, lavados, elución, CIP y agregado de solución de conservación.

Para evaluar la recuperación de ambas purificaciones, se tomaron alícuotas de cada una de las fracciones y se evaluaron por ELISA sándwich (Tabla 15).

Tabla 15: Porcentaje de GMOP₃-IFN-GMOP por CIA empleando la matriz mAb CC1H7-*Sepharose*. Se comparan condiciones de unión con y sin Na₂SO₄ 1 M y se indica la recuperación y pureza obtenida en cada procedimiento cromatográfico

	GMOP ₃ -IFN-GMOP			
	Sin sal		Na ₂ SO ₄ 1 M pH 8	
	Masa (µg)	%R	Masa (µg)	%R
Siembra	1416		1174	
FT	218	15	53	5
Lavado	276	19	37	3
Elución	576	41	1083	92
%R Global		75		100
Pureza (%)		90		95

Como se puede observar, la purificación de la variante GMOP₃-IFN-GMOP con el mAb CC1H7 reprodujo la misma tendencia previamente descrita para las variantes fusionadas al péptido mGMOP: en presencia de sal se logró una mayor retención de la proteína, con menores pérdidas en el FT y en el lavado. Asimismo, la recuperación en la elución fue superior al combinar la disminución de la fuerza iónica con el aumento del pH, obteniéndose más del doble de proteína respecto a la elución realizada solo por cambio de pH. Esto indica que se recuperaron 96 µg de la proteína por mL de resina cuando la purificación se realizó sin sal y 181 µg de la proteína por mL de resina cuando el procedimiento se realizó con la sal. Esto evidencia una mejora en la capacidad de retención bajo condiciones salinas como sucedió con las variantes fusionadas al péptido mGMOP. Los porcentajes de recuperación obtenidos para GMOP₃-IFN-GMOP fueron similares a los observados para la variante mGMOP₃-IFN-mGMOP (sección 1.2.4 de RyD), con valores de 92% y 91% en presencia de sal, y de 41% y 58% en ausencia de sal, respectivamente. Por otra parte, en ambos protocolos se alcanzaron altos niveles de pureza, evaluados por SDS-PAGE (Fig. 39).

De manera similar a la que se evaluó la pureza del método de CIA para las variantes mGMOP-IFN y mGMOP₃-IFN-mGMOP, se analizó la pureza de dicho procedimiento para GMOP₃-IFN-GMOP por HPLC-SEC. El cromatograma se muestra en la Fig. 40. La pureza alcanzada resultó de un 98%.

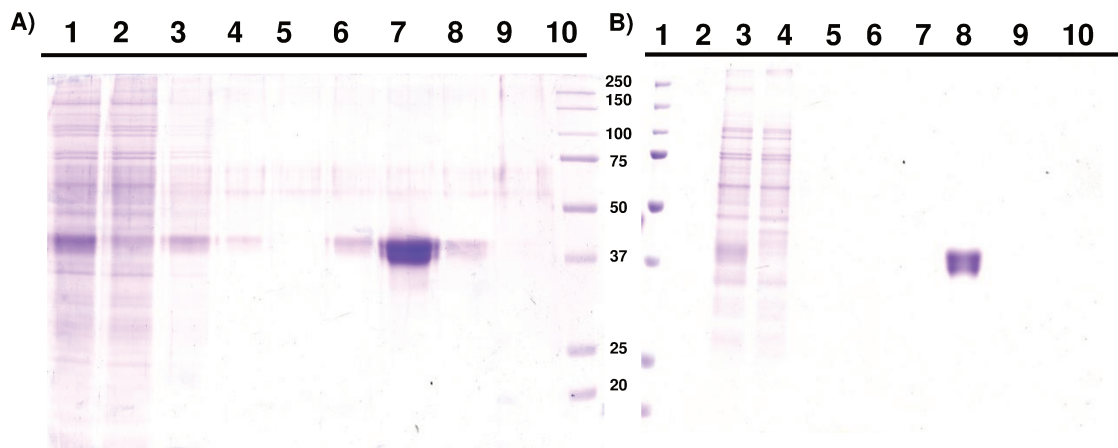


Figura 39: Evaluación del proceso de purificación de GMOP₃-IFN-GMOP por CIA empleando matriz mAb CC1H7-*Sepharose* mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y tinción con azul brillante de *Coomassie*. A) Condición sin sal. Calles: 1- Siembra; 2- FT; 3 y 4- Lavado; 5 y 6- Fracciones previas al pico; 7- Pico de elución; 8- Fracciones posteriores al pico; 9- Conservante; 10- MMM- B) Condición con Na₂SO₄ 1M. Calles: 1- MMM; 3- Siembra; 4- FT; 5 y 6- Lavado; 7- Fracciones de elución previas la pico; 8- Pico de elución; 9- Fracciones posteriores al pico; 10- Conservante.

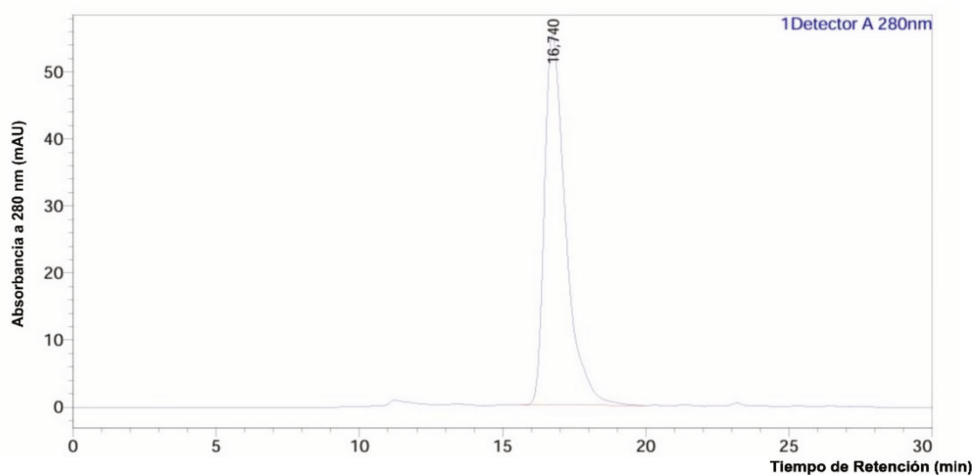


Figura 40: Evaluación de la pureza mediante SEC-UHPLC de GMOP₃-IFN-GMOP purificada por CIA empleando el mAb CC1H7 y Na₂SO₄ 1 M. Se registran los perfiles de elución a 280 nm y el tiempo de retención de la proteína a los 16,7 min.

En conjunto, estos resultados demuestran que el protocolo de CIA basado en el epítopo APAR y el mAb CC1H7 es eficaz para la purificación de proteínas fusionadas tanto al péptido mGMOP como al GMOP, alcanzando altos niveles de pureza y recuperación. Si bien la presencia de sal potencia notablemente la retención y la recuperación de la proteína, el procedimiento sin sal también resulta funcional y podría aplicarse en situaciones en las que la proteína de interés no tolere altas concentraciones salinas.

Las fracciones de elución obtenidas en cada cromatografía, correspondientes a la misma variante y condición, se combinaron, concentraron y diafiltraron contra PBS. La concentración final, determinada por lectura espectrofotométrica a $\lambda=280$ (sección 8.5 de MyM), fue de 1,1 mg.mL⁻¹ (sin sal) y 1,5 mg.mL⁻¹ (con sal) para GMOP₃-IFN-GMOP, y 1,6 mg.mL⁻¹ (sin sal) y 2,7 mg.mL⁻¹ (con sal) para mGMOP₃-IFN-mGMOP.

2.2.2. Purificación por CIA con mAb anti-hIFN- α 2b CA5E6

Para comparar el desempeño del nuevo sistema desarrollado y la calidad de las proteínas obtenidas, las variantes hiperglicosiladas de rhIFN se purificaron mediante CIA empleando una resina acoplada al mAb CA5E6. Este mAb, seleccionado de un panel de mAbs anti-hIFN- α 2b (Depetris, 2008), reconoce tanto la variante no glicosilada utilizada como inmunógeno como diversas variantes glicosiladas e hiperglicosiladas generadas por glicoingeniería en células CHO y HEK (Ceaglio y col., 2008; Gugliotta y col., 2013). Dado que este protocolo fue previamente validado en el laboratorio para la purificación de variantes de rhIFN- α 2b, se empleó como referencia para comparar con el método basado en la interacción epítopo APAR-mAb CC1H7. Para evitar contaminaciones cruzadas, se emplearon matrices individuales para la purificación de cada variante.

El mAb CA5E6, purificado previamente a partir de ascitis murina, fue acoplado a una resina de *Sepharose*TM activada con CNBr, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 7.1.1 de MyM. Se prepararon 14 mL de resina, obteniéndose un porcentaje de acoplamiento del 90%. La capacidad teórica de la matriz mAb CA5E6-*Sepharose* fue de 0,9 mg de GMOP₃-IFN-GMOP y 1,05 mg de mGMOP₃-IFN-mGMOP por mL. Estos valores fueron similares a los obtenidos para el mAb CC1H7, por lo que se consideraron adecuados para el procedimiento posterior de CIA.

Se realizó la purificación de las variantes de rhIFN a partir de los sobrenadantes de cultivo de las líneas adaptadas, empleando 6 ml de matriz de IAF mAb CA5E6-*Sepharose* para cada una. Se llevaron a cabo 4 ciclos, empleando 100 ml de cosecha en cada uno, de manera de no superar la capacidad teórica calculada de la matriz. En la Fig. 41 se presenta, a modo ilustrativo, el proceso cromatográfico correspondiente a una purificación de cada variante.

Para evaluar el rendimiento de los procesos de purificación, se tomaron muestras representativas de las distintas etapas de todas las cromatografías y se determinó la concentración de rhIFN presente mediante ELISA sándwich (Tabla 16). Los rendimientos obtenidos en la etapa de elución oscilaron entre 40 y 70%. Se observó una pérdida significativa de proteína en el FT de la variante GMOP₃-IFN-GMOP (aproximadamente un 40%) probablemente debido a la saturación de la resina. Esta hipótesis se ve respaldada por el hecho de que, al sembrar menos masa de la variante mGMOP₃-IFN-mGMOP, la pérdida en el FT se redujo a un 1%. Un comportamiento similar se observó en los lavados, donde la pérdida de proteína fue mayor para la primera variante en comparación con la segunda. Asimismo, en el caso de la variante con el péptido mGMOP, no se logró una elución completa, quedando un 26% de proteína retenida en la matriz de inmunoafinidad. Para la variante del péptido GMOP, la masa retenida fue mucho menor, representando apenas 3%.

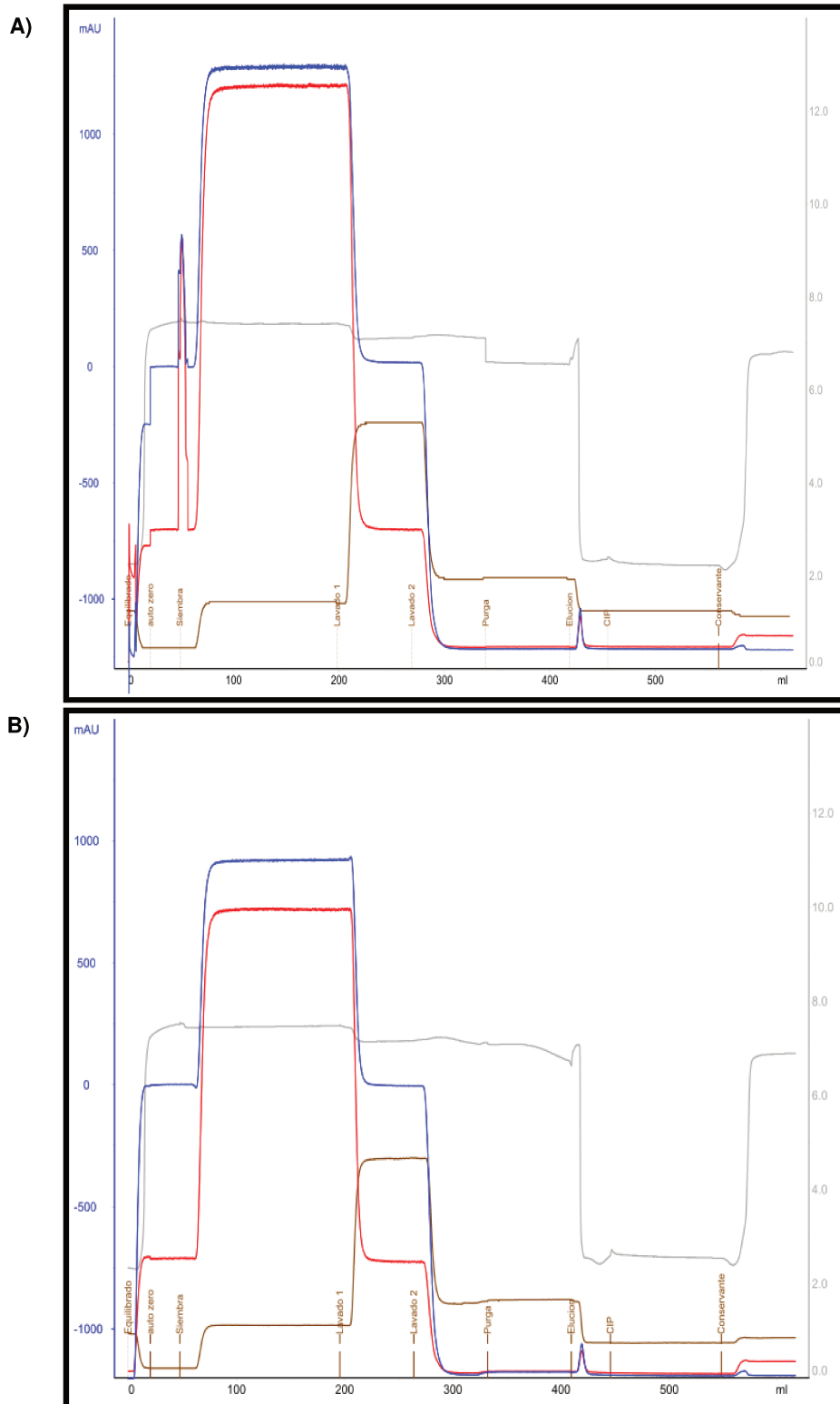


Figura 41: Purificación de GMOP₃-IFN-GMOP (A) y de mGMOP₃-IFN-mGMOP (B) por CIA empleando matriz de mAb CA5E6-*Sepharose*. En el cromatograma se representan las señales de absorbancia a $\lambda=280$ nm (azul), y $\lambda=254$ nm (rojo), conductividad (marrón) y pH (gris) en función al volumen de elución (mL). Se indica, el inicio de las etapas de equilibrado, siembra, lavados, elución, CIP y de agregado de solución de conservación.

Tabla 16: Análisis de la recuperación porcentual (%R) obtenida durante la purificación de GMOP₃-IFN-GMOP y mGMOP₃-IFN-mGMOP por CIA empleando mAb CA5E6-*Sepharose*

	GMOP ₃ -IFN-GMOP		mGMOP ₃ -IFN-mGMOP	
	Masa (µg)	%R	Masa (µg)	%R
Siembra	1599		995	
FT	654	41	10	1
Lavado 1	218	14	47	5
Lavado 2	26	2	11	1
Elución	650	41	664	67
CIP	0,3	0,02	3,2	0,3
Conservante	0,1	0,01	3	0,3
%R Global		97		74

Estos resultados son acordes a los reportados por Sales y col. (2021) para las variantes GMOP-IFN y mGMOP-IFN, cuyos rendimientos en la etapa de elución oscilaron entre 59 y 75%. Por otro lado, la cantidad de masa recuperada por mL de resina fue menor en este caso (108-110 µg por mL de resina) que en la purificación realizada con CC1H7 + Na₂SO₄ 1M (150-180 µg por mL de resina). Esto podría deberse a variaciones en la cinética de unión/desunión, que reducirían la fracción efectivamente retenida y eluida; a una mayor sensibilidad de la proteína a las condiciones de elución (pH o fuerza iónica), lo que disminuiría la eficiencia de recuperación; o a heterogeneidad molecular, donde ciertas subpoblaciones podrían presentar el epítipo reconocido por mAb CA5E6 parcialmente oculto y, por lo tanto, unirse o eluirse con menor eficiencia. Dado que este mAb fue generado frente al IFN-wt, es posible que la fusión de secuencias peptídicas en los extremos N y/o C modifique la accesibilidad o disposición del epítipo reconocido. En proteínas de pequeño tamaño, como el rhIFN (~19 kDa), la adición de péptidos (como GMOP o CTP) puede inducir cambios en la conformación global, reordenamientos locales o interferencia estérica directa, dificultando el acceso del anticuerpo al epítipo. Finalmente, la pureza obtenida se evaluó por SDS-PAGE seguido de tinción con azul brillante de *Coomassie* (Fig. 42 y 43).

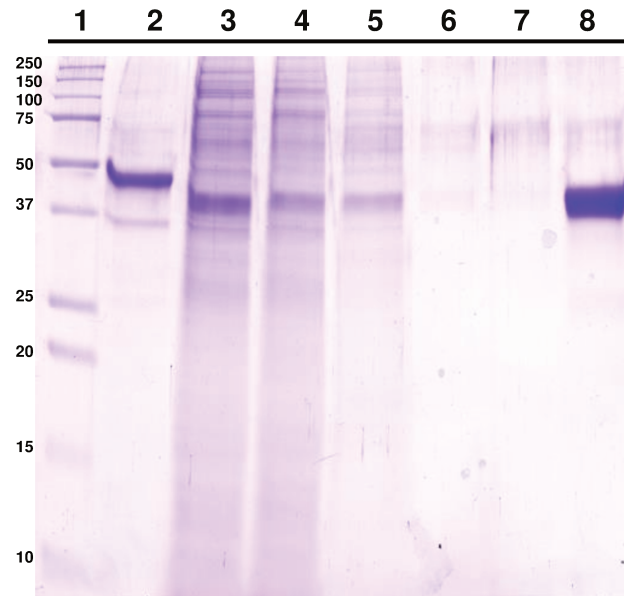


Figura 42: Evaluación del proceso de purificación de GMOP₃-IFN-GMOP por CIA con mAb CA5E6 mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y tinción con azul brillante de Coomassie. Calles: 1- MMM; 2- Control mGMOP₃-IFN-mGMOP purificado previamente (Iturraspe y col., 2019); 3- Siembra; 4- FT; 5- Lavado 1; 6- Lavado 2; 7- Fracciones fuera del pico de elución; 8- Pico de elución.

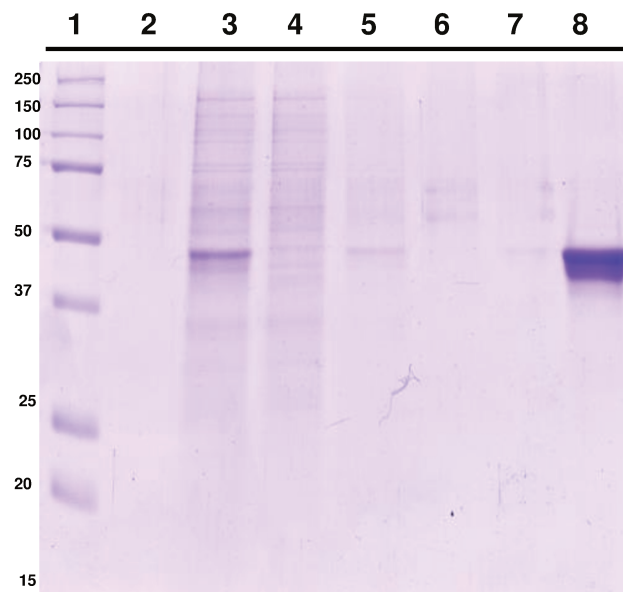


Figura 43: Evaluación del proceso de purificación de mGMOP₃-IFN-mGMOP por CIA con mAb CA5E6 mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y tinción con azul brillante de Coomassie. Calles: 1- MMM; 3- Siembra; 4- FT; 5- Lavado 1; 6- Lavado 2; 7-Fracciones de elución no correspondientes al pico; 8- Pico de elución.

Se puede observar que, para la variante GMOP₃-IFN-GMOP, el perfil electroforético del FT es prácticamente idéntico al de la muestra sembrada, al igual que el del lavado 1. Esto concuerda con lo mencionado anteriormente respecto a la saturación de la resina y la consecuente pérdida de la proteína de interés en estas etapas. En cambio, para mGMOP₃-IFN-mGMOP, se observa una menor intensidad de bandas en el FT y lavado 1, sin evidencias claras de la presencia de la variante en dichas fracciones. En ambos casos, la mayoría de las impurezas adsorbidas

durante la siembra fueron removidas en el lavado 1. La pureza calculada por densitometría fue del 80% para GMOP₃-IFN-GMOP y 95% para mGMOP₃-IFN-mGMOP, valores adecuados para un único paso de purificación y aceptables para continuar con su caracterización.

Las fracciones de elución obtenidas en cada proceso se mezclaron, concentraron y diafiltraron contra PBS. La concentración final, determinada por lectura espectrofotométrica a $\lambda=280$ (sección 8.5 de MyM), fue de 1,9 mg.mL⁻¹ para GMOP₃-IFN-GMOP y 3,0 mg.mL⁻¹ para mGMOP₃-IFN-mGMOP.

2.2.3. Comparación de los procesos cromatográficos

Teniendo en cuenta los resultados de las diferentes CIAs, se puede concluir que el protocolo basado en el sistema mGMOP-mAb CC1H7 en presencia de Na₂SO₄ mostró rendimientos superiores para ambas variantes tanto en comparación con el mismo protocolo en ausencia de sal como con el sistema rhIFN-mAb CA5E6 (alrededor de 90% versus 41-58% y 41-67%, respectivamente). Estos resultados refuerzan la hipótesis de que el agregado de sal favorece la interacción entre el epítopo APAR, presente en ambos péptidos (mGMOP y GMOP), y el mAb CC1H7, probablemente al disminuir efectos de repulsión y favorecer las interacciones hidrofóbicas. En cuanto a la pureza, los valores alcanzados fueron comparables en todos los protocolos (Fig. 44).

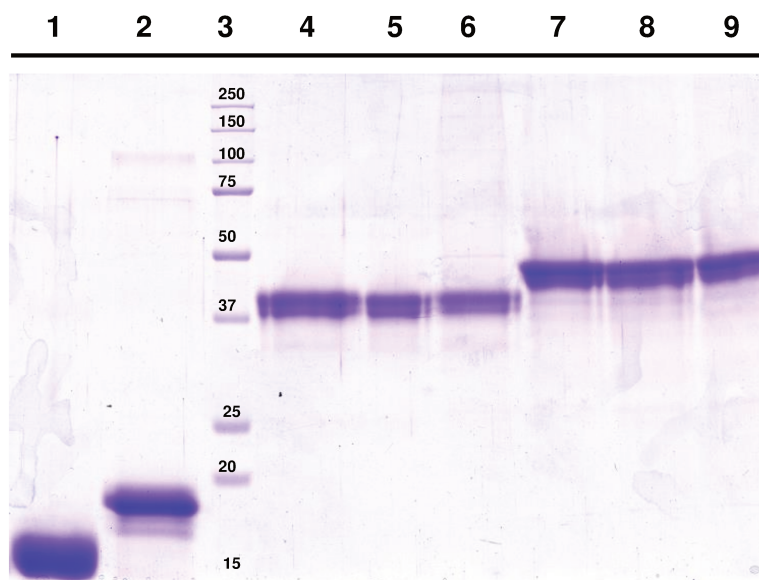


Figura 44: Evaluación de la pureza de las variantes hiperglicosiladas de rhIFN purificadas por CIA inmovilizando mAb CA5E6 o mAb CC1H7. El análisis se llevó a cabo mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y tinción con azul brillante de *Coomassie*. **Calles:** 1- IFN-NG; 2- IFN-wt; 3- MMM; 4 a 6- GMOP₃-IFN-GMOP purificado utilizando: mAb CA5E6, mAb CC1H7 sin sal y mAb CC1H7 con Na₂SO₄ 1 M, respectivamente; 7 a 9- mGMOP₃-IFN-mGMOP purificado por CIA con: mAb CA5E6, mAb CC1H7 sin sal y mAb CC1H7 con Na₂SO₄ 1 M, respectivamente.

De este modo, se estableció un protocolo de purificación robusto y versátil aplicable proteínas fusionadas con cualquiera de los péptidos desarrollados, que optimiza tanto la recuperación como la eficiencia global del proceso. Las proteínas obtenidas fueron utilizadas para su caracterización exhaustiva, con el objetivo de evaluar la calidad del material purificado mediante el sistema basado en el mAb CC1H7.

2.3. Caracterización de las variantes de rhIFN

La caracterización integral de proteínas recombinantes constituye una etapa fundamental en el desarrollo de biomoléculas, ya que brinda información detallada sobre sus propiedades fisicoquímicas, estructurales y funcionales. Estos análisis permiten definir la pureza del producto, su estabilidad y actividad biológica. Los resultados obtenidos no sólo confirman la identidad y la integridad estructural de la proteína, sino que también permiten evaluar su comportamiento funcional en condiciones experimentales, aportando información clave para su desarrollo y aplicación futura.

En este marco, se llevó a cabo el análisis y caracterización de las variantes de rhIFN con relación a su contenido glicosílico, estructura tridimensional y actividad biológica específica, tanto *in vitro* como *in vivo*, así como su perfil farmacocinético. Todas las determinaciones se efectuaron en comparación con la molécula de IFN-wt, obtenida previamente en el laboratorio mediante cultivo de células CHO-K1 y posterior purificación por CIA utilizando el mAb CA5E6.

2.3.1. Caracterización analítica – Análisis de glicofomas

2.3.1.1. SDS-PAGE/*Western blot*

Con el fin de analizar el grado de glicosilación de las nuevas variantes de rhIFN mediante la estimación de sus masas moleculares aparentes, se realizó un ensayo de SDS-PAGE en condiciones reductoras y desnaturizantes, seguido de *western blot*. La detección se llevó a cabo con un pAb de conejo anti-rhIFN- α 2b y, en paralelo, con el mAb CC1H7, evaluando por primera vez su capacidad para reconocer a la proteína fusionada al péptido GMOP y su especificidad en el contexto del sobrenadante de cultivo (Fig. 45).

El pAb detectó todas las formas de rhIFN, incluyendo la proteína no glicosilada (IFN-NG, producida en bacterias), la molécula no modificada y naturalmente O-glicosilada (IFN-wt, producida en células CHO) y las variantes fusionadas a ambos péptidos. Esto indica que la incorporación de las etiquetas no afectó su capacidad de unión. No obstante, se observó un mayor *background* (del inglés; ruido de fondo o señal inespecífica de fondo) en comparación con la detección realizada con el mAb CC1H7. La utilización del pAb en el contexto de una muestra compleja como el suero, en comparación con el empleo de un mAb purificado por cromatografía a proteína A, junto con la potencial reactividad cruzada inherente a los pAb, explican el mayor ruido de fondo observado. Aunque los sueros policlonales se utilizan

habitualmente para la detección de proteínas en baja concentración, el mAb CC1H7 mostró igualmente una adecuada capacidad de detección de las proteínas de fusión en el sobrenadante de cultivo, exhibiendo una elevada intensidad de señal y menor *background*.

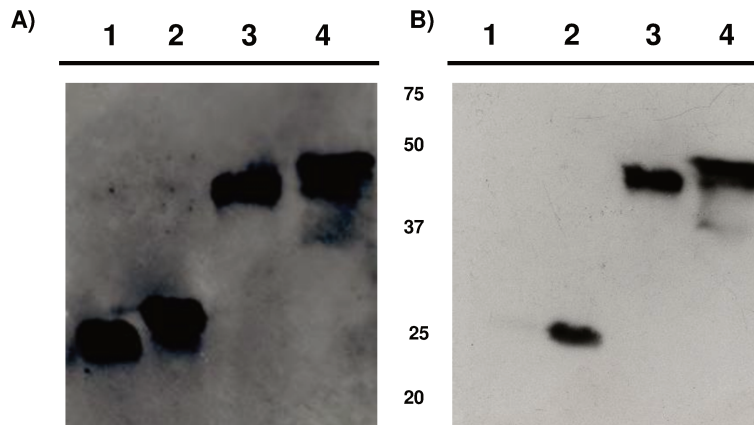


Figura 45: Evaluación del perfil de masa molecular de las variantes de rhIFN mediante SDS-PAGE y posterior *western blot*. **A)** Detección con pAb anti-IFN. **Calles: 1-** IFN-NG; **2-** IFN-wt; **3-** GMOP₃-IFN-GMOP; **4-** mGMOP₃-IFN-mGMOP. **B)** Detección con mAb CC1H7. **Calles: 1-** IFN-NG **2-** GM-CSF; **3-** GMOP₃-IFN-GMOP; **4-** mGMOP₃-IFN-mGMOP.

Por otra parte, ambas variantes exhibieron perfiles similares, con bandas amplias producto de la heterogeneidad característica de la O-glicosilación, aunque menos difusas que la amplitud de bandas observadas en proteínas N-glicosiladas. Las MM aparentes promedio fueron aproximadamente de 40-45 kDa para GMOP₃-IFN-GMOP y de 40-50 kDa para mGMOP₃-IFN-mGMOP, valores considerablemente superiores a los observados para el IFN-NG (~21 kDa) y el IFN-wt (~25 kDa). Estos resultados indican que la incorporación de los péptidos derivados de hGM-CSF promovió la adición de glicanos de tipo O, lo que se tradujo en un incremento notable de la MM de las nuevas proteínas. Teniendo en cuenta que los péptidos constan de 14 (GMOP) o 15 aminoácidos (mGMOP), el aporte esperado por la región peptídica sería de aproximadamente 6-7 kDa (considerando una masa molecular promedio de 110 Da por aminoácido y 4 copias por molécula). Sin embargo, el aumento observado supera ampliamente ese valor, confirmando que el agregado de glicanos constituye la principal causa de dicha diferencia. Finalmente, la variante mGMOP₃-IFN-mGMOP mostró una mayor cantidad de isoformas y una MM ligeramente superior en comparación con la variante GMOP₃-IFN-GMOP. Esta diferencia se debe al mayor número de sitios susceptibles a O-glicosilación en la secuencia del péptido mGMOP, lo que resulta en un incremento del contenido total de glicanos en la proteína.

2.3.1.2. O-deglicosilación

La presencia de O-glicanos en las proteínas de fusión fue confirmada mediante el tratamiento secuencial con enzimas glicosidasas (sección 9.1.3 de MyM). Este enfoque fue necesario debido a las limitaciones de la O-glicosidasa, una endoglicosidasa que sólo puede remover oligosacáridos tipo mucina de *core* 1 (Gal β 1-3GalNAc α 1-O-Ser/Thr) y, en menor medida, de *core* 3 (GlcNAc β 1-3GalNAc), siempre que sus residuos terminales no se encuentren modificados. Dado que la enzima no actúa sobre glicanos sialilados o ramificados, se realizó un pretratamiento enzimático con neuraminidasa (para remover residuos de ácido siálico), seguido de β 1-3 galactosidasa (para eliminar galactosas terminales que se encuentren antes del *core*) y β -N-acetilhexosaminidasa (para remover N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina, unidas al *core*). Este tratamiento previo expone el disacárido *core*, permitiendo finalmente la acción de la O-glicosidasa a nivel del enlace O-glicosídico que une el glicano al residuo de serina o treonina. Las muestras tratadas fueron analizadas mediante SDS-PAGE seguido de tinción con azul brillante de *Coomasie* (Figura 46).

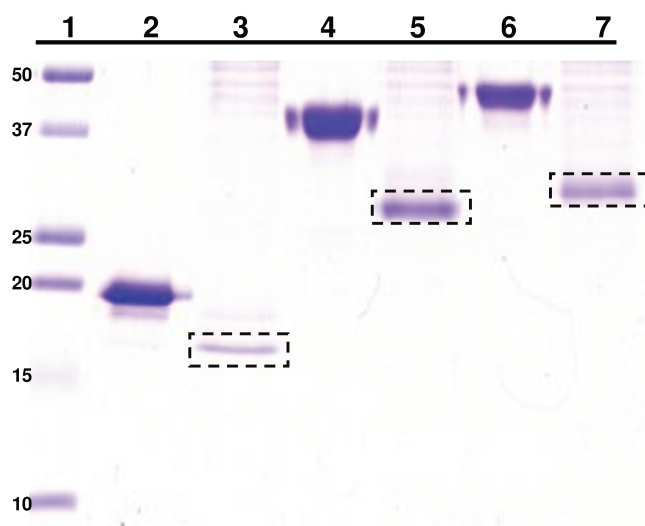


Figura 46: O-deglicosilación enzimática del IFN-wt y de las variantes GMOP₃- IFN-GMOP y mGMOP₃-IFN-mGMOP evaluada mediante SDS-PAGE. Calles: 1- MMM; 2- IFN-wt sin tratar; 3- IFN-wt O-deglicosilado; 4- GMOP₃-IFN-GMOP sin tratar; 5- GMOP₃-IFN-GMOP O-deglicosilado; 6- mGMOP₃-IFN-mGMOP sin tratar; 7- mGMOP₃-IFN-mGMOP O-deglicosilado. Los recuadros con líneas discontinuas indican las proteínas resultantes del proceso de remoción de O-glicanos.

Luego de la O-deglicosilación, IFN-wt mostró una disminución en su masa molecular aparente, alcanzando un valor de aproximadamente 19 kDa, el cual coincide con la MM del IFN-NG. Este resultado confirmó la eliminación de los O-glicanos y validó la eficacia del protocolo utilizado. Las variantes de rhIFN también demostraron una disminución de su masa molecular aparente luego del tratamiento enzimático, desde 40 kDa (GMOP₃-IFN-GMOP) y 46 kDa (mGMOP₃-IFN-mGMOP), hasta 29 y 32 kDa, respectivamente. Esta reducción de 11 y 14 kDa

confirma la presencia de O-glicanos y su contribución al incremento de masa observado en las formas glicosiladas.

Cabe destacar que, luego de la O-deglicosilación, ambas variantes migraron por encima del IFN-NG, lo cual se explica por la presencia de los péptidos GMOP o mGMOP. Asimismo, la variante GMOP₃-IFN-GMOP migró como una única banda con una masa molecular aparente ligeramente inferior a mGMOP₃-IFN-mGMOP, en concordancia con el mayor tamaño del péptido mGMOP.

2.3.1.3. IEF

La técnica de IEF permite la separación analítica de moléculas según su pI, ya que migran en función a su carga eléctrica a través de un gradiente de pH generado por anfolitos sometidos a la aplicación de una diferencia de potencial. Este gradiente de separación se establece entre el ánodo (región ácida) y el cátodo (región básica). Cada molécula se desplazará hasta alcanzar el pH correspondiente a su pI, punto en el cual su carga neta es nula y cesará en su movilidad. Las variantes hiperglicosiladas de rhIFN purificadas mediante CIA empleando diferentes mAb y protocolos fueron analizadas mediante IEF en comparación con el IFN-wt, utilizando un gradiente de pH 3-5 (Figura 47).

En la primera calle (correspondiente al IFN-wt) se observaron entre 3 y 4 isoformas no resueltas que indicarían microheterogeneidad debida a la distinta composición del O-glicano unido al residuo Thr106. Este residuo, al encontrarse expuesto en la superficie de la molécula, favorece una alta eficiencia de ocupación. Las glicoproteínas humanas presentan diferentes estructuras de glicanos: aproximadamente el 75% de las moléculas contiene el disacárido Gal β 1-3GalNAc (*core 1*), sin sustituir o modificado con uno o dos residuos de ácido siálico; mientras que el 25% restante presenta la estructura Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc (*core 2*) (Adolf y col., 1991). En particular, se ha descrito una proporción similar para la citoquina humana IFN- α 2b derivada de leucocitos, con alrededor de un 80% de glicanos de tipo *core 1* y un 20 % de tipo *core 2* (Nyman y col., 1998). Si bien no se han reportado valores específicos para el hIFN- α 2b producido en células CHO, los glicanos de tipo *core 1* suelen predominar, dando origen a isoformas con diferente grado de sialilación.

La baja resolución de las isoformas observadas podría deberse a que el rango de pH empleado es más ácido (pH 3-5) que el habitualmente empleado para enfocar las isoformas del IFN-wt (pH 4,5-7). No obstante, se priorizó el rango más bajo para optimizar la resolución de las nuevas variantes hiperglicosiladas.

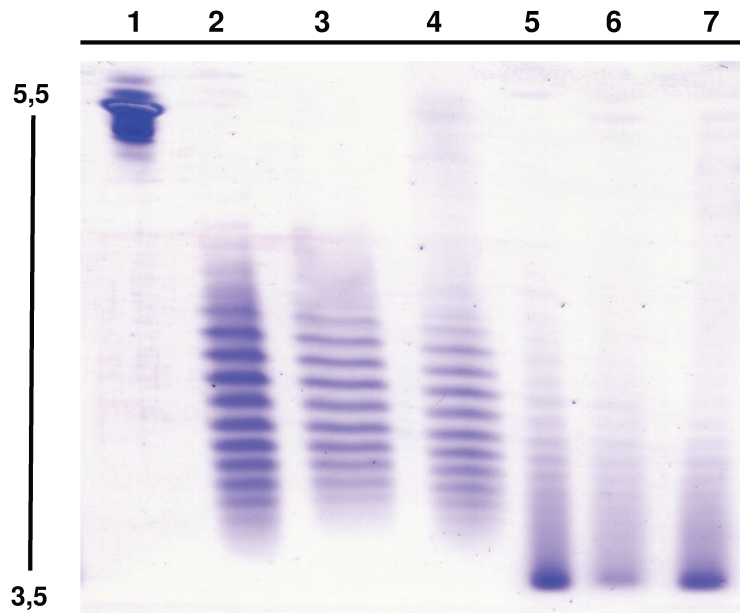


Figura 47: Análisis del patrón de isoformas de las variantes O-glicosilados de rhIFN mediante IEF.
Calles: 1- IFN-wt.; 2 a 4- GMOP₃-IFN-GMOP purificado por CIA con: mAb CA5E6, mAb CC1H7 sin sal y mAb CC1H7 con Na₂SO₄ 1 M, respectivamente; 5 a 7- mGMOP₃-IFN-mGMOP purificado por CIA con: mAb CA5E6, mAb CC1H7 sin sal, mAb CC1H7 con Na₂SO₄ 1 M, respectivamente.

Con relación a cada una de las variantes, se observa que los diferentes métodos de purificación producen patrones de isoformas similares. En algunos casos, determinadas muestras presentan menor intensidad de bandas, probablemente por diferencias en la masa sembrada. Sin embargo, se observa claramente que el perfil de isoformas resultante a partir de la aplicación del sistema de purificación basado en el mAb CC1H7 es similar frente al método de referencia del laboratorio para la purificación de muteínas de rhIFN, particularmente para la proteína de fusión con GMOP cuyas isoformas demuestran una adecuada resolución en el rango de pH utilizado para el procedimiento de IEF.

Por otro lado, ambas variantes mostraron un mayor número de isoformas con respecto al IFN-wt, localizadas predominantemente en la región ácida del gel. Este perfil es un claro indicador de que la incorporación de nuevos hidratos de carbono en la molécula de hIFN incrementa el contenido de residuos de ácido siálico, lo que disminuye el pI y aumenta consecuentemente las cargas negativas de la proteína al pH de siembra. El aumento de las formas ácidas fue reportado previamente por Iturraspe y col. (2019), evidenciándose a partir de la incorporación de 2 o más etiquetas mGMOP a la misma proteína.

Además, la variante con el péptido mGMOP presentó isoformas aún más ácidas que la quimera con GMOP, las cuales no pudieron resolverse en el gradiente de pH establecido. Esto se atribuye al mayor número de sitios O-glicosilados o a una mayor incorporación de residuos de ácidos siálicos en la variante mGMOP, lo que explicaría pI más bajos.

Es interesante destacar que el patrón de las isoformas observado para las variantes hiperglicosiladas del péptido mGMOP resulta más desplazado hacia la región ácida del

gradiente, en comparación con el patrón reportado por Gugliotta y col. (2017) para un rhIFN hiper N-glicosilado con 6 sitios potenciales de N-glicosilación. En dicho caso, la distribución de isoformas fue más heterogénea abarcando un rango de pH más amplio. Esta diferencia podría deberse a que la N-glicosilación genera una mayor diversidad estructural en las cadenas de carbohidratos y mayor variabilidad en las cargas eléctricas negativas. Asimismo, el número teórico máximo de ácidos siálicos para la variante hiper-N-glicosilada es de aproximadamente 26 moles de Neu5Ac por mol de proteína, mientras que la variante hiper-O-glicosilada que contiene el péptido mGMOP alcanza un valor teórico de 56 moles de Neu5Ac por mol de proteína. Esta diferencia en la carga negativa total explica su marcada migración hacia regiones más ácidas del gradiente y la menor resolución de las isoformas en ese rango de pH.

2.3.1.4. Evaluación del contenido de ácido siálico

Dado que el ácido siálico es una molécula crítica para determinar la bioactividad *in vivo* — especialmente en lo que respecta a la vida media en circulación— su contenido representa un atributo de calidad fundamental en la producción de biofármacos, requiriendo un análisis cuantitativo preciso.

Mediante hidrólisis ácida seguida de HPAEC-PAD, se determinó el contenido de Neu5Ac en las muteínas purificadas por los distintos métodos y se lo comparó con el correspondiente al IFN-wt. El contenido de ácido siálico, expresado como moles de ácido siálico por mol de proteína, fue similar entre las proteínas obtenidas mediante los tres métodos de purificación, sin diferencias significativas para cada variante (Fig. 48). Los gráficos de caja muestran medianas comparables y una dispersión variable, lo que indica que el método de purificación no afecta el contenido de ácido siálico ni favorece el enriquecimiento de isoformas específicas. No obstante, al comparar los valores obtenidos para cada variante con los del IFN-wt, se observaron diferencias marcadas (Fig. 49). Dado que el IFN-wt posee únicamente un sitio de O-glicosilación, el contenido máximo teórico de ácido siálico que podría incorporar es de 2 moles de ácido siálico por mol de proteína, coincidiendo los valores experimentales con lo esperado. En cuanto a las variantes, de acuerdo con el análisis *in silico*, GMOP₃-IFN-GMOP presenta entre 16 y 20 sitios potenciales de O-glicosilación, lo que se traduce en un máximo teórico de 32 a 40 moles de ácido siálico por mol de proteína. Por su parte, mGMOP₃-IFN-mGMOP posee entre 24 y 28 sitios potenciales, equivalentes a un máximo de 48 a 56 moles de ácido siálico por mol de proteína. Habitualmente, la ocupación de los sitios suele ser incompleta. Para ambas variantes, el contenido de ácido siálico fue aproximadamente la mitad del máximo calculado: 18 ± 2 moles de ácido siálico por mol de GMOP₃-IFN-GMOP y 24 ± 1 moles de ácido siálico por mol de mGMOP₃-IFN-mGMOP. Este resultado es coherente, ya que sugiere que al menos una de las dos antenas de cada estructura de O-glicano está

sialilada, que algunos ácidos siálicos fueron removidos durante el cultivo por factores que afectan la glicosilación o que no todos los sitios potenciales de O-glicosilación están ocupados (Ngantung, 2005). Estos valores, además, representan 5 veces más contenido de ácido siálico que lo reportado para las variantes con un solo péptido, con valores de $3,3 \pm 0,1$ mol de Neu5Ac por mol de proteína para GMOP-IFN y $4,7 \pm 0,2$ mol de Neu5Ac por mol de proteína para mGMOP-IFN (Sales y col., 2021).

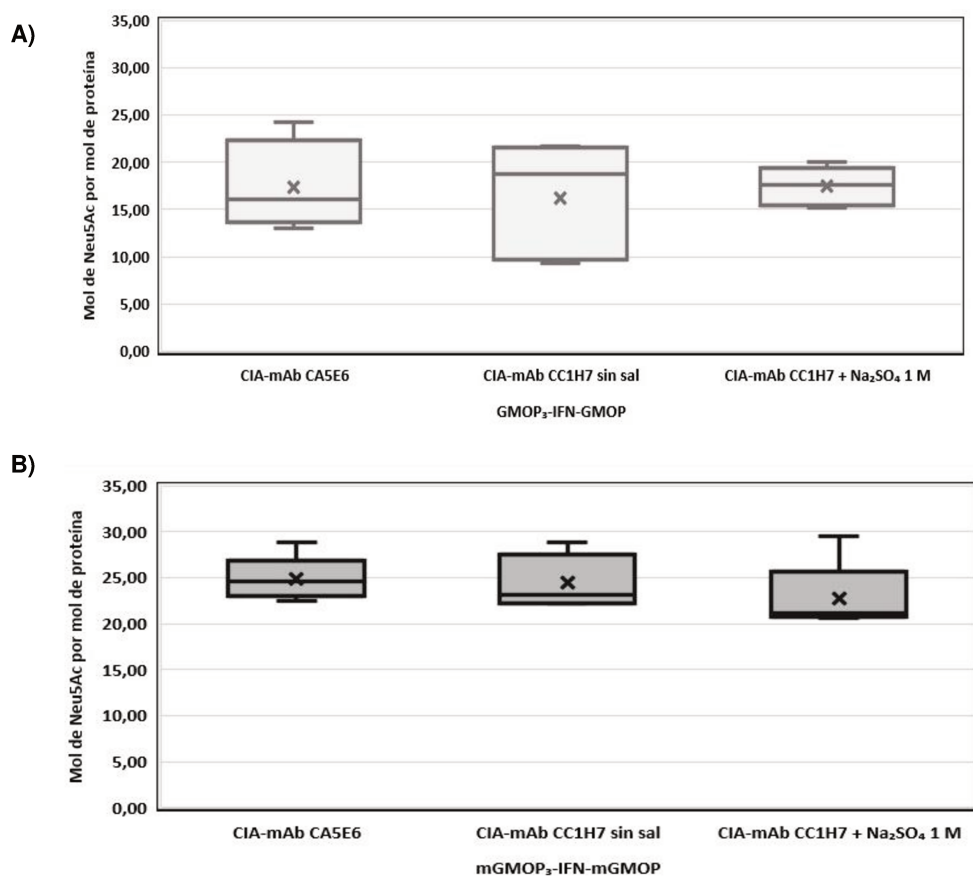


Figura 48: Contenido de ácido siálico de cada variante purificada por distintos métodos. Los gráficos de caja muestran los moles de Neu5Ac por mol de proteína para **A)** GMOP₃-IFN-GMOP y **B)** mGMOP₃-IFN-mGMOP.

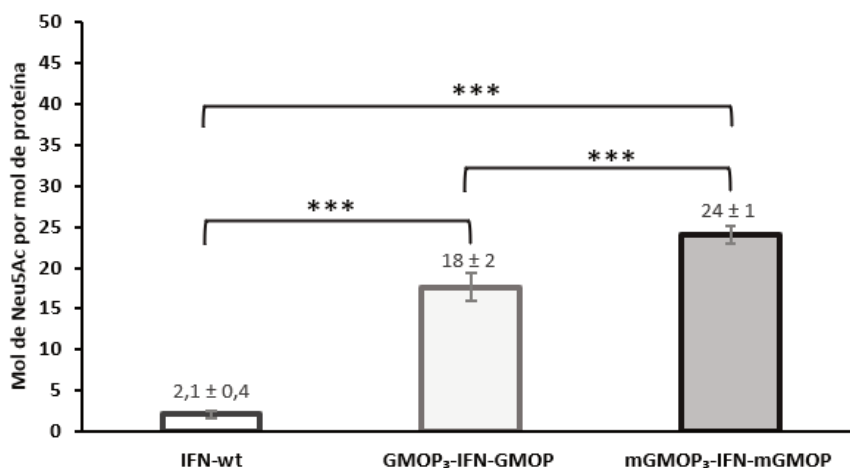


Figura 49: Contenido de ácido siálico de las variantes fusionadas a los péptidos GMOP y mGMOP en comparación con IFN-wt. Las muestras fueron sometidas a hidrólisis ácida y posteriormente evaluadas mediante HPAEC-PAD. El gráfico muestra el promedio \pm SD de los resultados obtenidos en 5 ensayos independientes. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas: *** ($p < 0,01$).

Estos hallazgos se correlacionan con los estudios de MM y con el análisis de isoformas de carga mediante IEF, los cuales muestran un incremento en la MM y un perfil de isoformas más ácidas de la variante fusionada a los péptidos mGMOP que la variante fusionada con los péptidos GMOP.

2.3.2. Estudio de la estructura tridimensional

2.3.2.1. Dicroísmo circular

El dicroísmo circular es una herramienta que permite analizar y monitorear los cambios estructurales de una proteína que pueden ocurrir al variar las condiciones de su entorno, como el pH, la temperatura o la fuerza iónica (Martin y Schilstra, 2008). Dada esta utilidad, las muestras de rhIFN, purificadas mediante las distintas estrategias cromatográficas (CIA con mAb CA5E6 o con mAb CC1H7, en presencia y ausencia de sal) fueron evaluadas para determinar si el uso de sales y pH elevado afectan su estructura. Con este fin, se registraron sus espectros de dicroísmo circular en la región del UV cercano y en el lejano. Además, como referencia, se registraron los espectros correspondientes al IFN-NG e IFN-wt y se calculó la elipticidad molar por residuo para representar los espectros obtenidos en el UV lejano (Figura 50A y 50B) y en el UV cercano (Figura 50C).

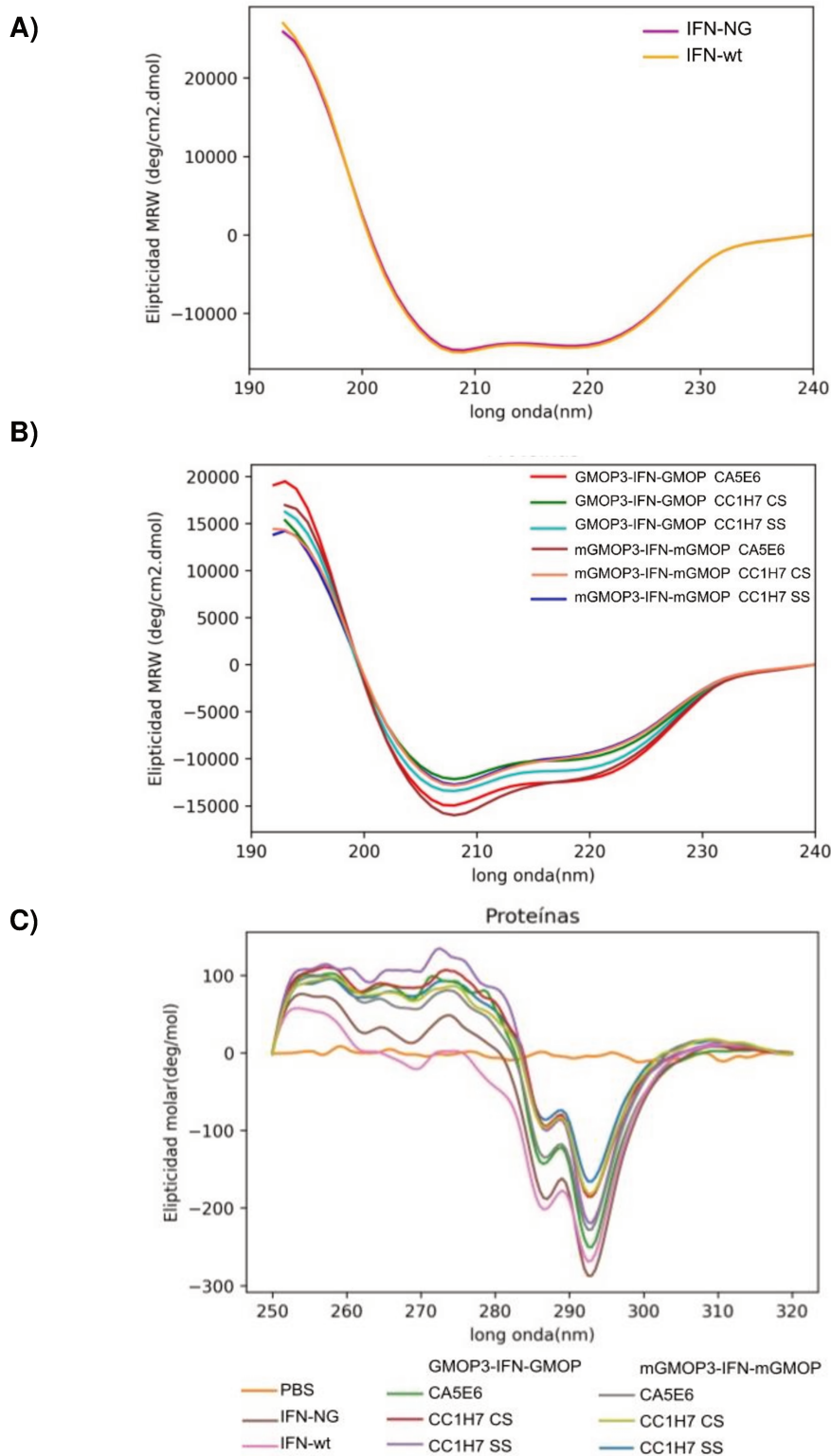


Figura 50: Análisis de la estructura de las variantes de rhIFN mediante dicroísmo circular. A) Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano de las muestras IFN-NG e IFN-wt. **B)** Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano de las muestras GMOP₃-IFN-GMOP y mGMOP₃-IFN-mGMOP purificadas por los distintos métodos cromatográficos (mAb CA5E6 o mAb CC1H7 con Na₂SO₄ (CS) y sin sal (SS)). **C)** Espectros de dicroísmo circular en el UV cercano de todas las muestras analizadas.

Los espectros de UV lejano mostraron características típicas de proteínas con alto contenido de α -hélices, con bandas negativas alrededor de 210 y 220 nm y una banda positiva

pronunciada hacia 190 nm. Este comportamiento es esperable, ya que el hIFN- α 2b contiene 4 α -hélices en su estructura, y se refleja claramente en los espectros obtenidos para el IFN-NG e IFN-wt (Fig. 50A). En el caso de las variantes, los espectros presentan perfiles similares, aunque no coinciden completamente entre sí ni con los correspondientes a los rhIFNs de referencia. Estas diferencias sugieren que las variantes poseen un menor porcentaje relativo de estructuras tipo α -hélices (alrededor del 30%) en comparación con el IFN-NG e IFN-wt (con un 40% de estructuras de este tipo). Esta menor proporción puede explicarse por la presencia de otras estructuras desordenadas o estructuras alternativas generadas por la incorporación de los péptidos en los extremos del hIFN (Fig. 50B).

Los espectros de UV cercano (250–320 nm) (Fig. 50C) exhibieron una serie de bandas estructuradas correspondientes a las transiciones electrónicas de aminoácidos aromáticos, que resultaron similares entre todas las muestras. Esto indica que las estructuras terciarias de las variantes son comparables entre sí y con las moléculas de referencia.

En conjunto, estos resultados sugieren que las muteínas mantienen su integridad estructural, conservando una organización tridimensional similar luego del proceso de purificación mediante cualquiera de los métodos empleados. El mantenimiento de la estructura terciaria es clave, ya que esta conformación es necesaria para la interacción con el receptor celular que iniciará los mecanismos de transducción de señales para desplegar la actividad biológica de los IFNs.

2.3.2.2. Thermal Shift Assay

La función y actividad de las proteínas dependen en gran medida de su estructura y estabilidad en un entorno dado. El ensayo de desplazamiento térmico o *thermal shift assay* es una herramienta eficaz para evaluar la estabilidad de proteínas frente a diversos factores, tales como el pH, la fuerza iónica y la presencia de excipientes o ligandos específicos o inespecíficos. Este método se utiliza de forma rutinaria para estudiar el comportamiento de las proteínas en diferentes soluciones y predecir las condiciones óptimas para su formulación (Petrauskas y col., 2024).

Este ensayo permite monitorear el proceso de desnaturalización de la proteína mediante el registro de la fluorescencia a medida que se incrementa la temperatura de forma controlada, lo que provoca la exposición del núcleo hidrofóbico de la molécula. Para ello, se emplean colorantes que se unen a las regiones no polares de la proteína parcialmente desplegada, generando un aumento en la emisión fluorescente. El aumento progresivo de la temperatura desplaza el equilibrio de la proteína desde su estado nativo, plegado, hacia un estado globular fundido, que conserva una estructura secundaria similar a la nativa, pero presenta una estructura terciaria más laxa. La temperatura a la cual las concentraciones de ambos estados son equivalentes se define como temperatura de fusión o de melting (T_m), que representa el

punto medio de la transición de desnaturalización (Bhayani y Ballicora, 2022; Mahran y col., 2023).

La estabilidad térmica de las variantes de rhIFN obtenidas por las diferentes estrategias de purificación se evaluó mediante un ensayo de *thermal shift* en comparación con el IFN-NG e IFN-wt. Como se puede observar en las Fig. 51A y 51B, las curvas de fusión correspondientes a cada variante fueron similares entre sí, independientemente del método de purificación empleado. Estos resultados indican que la estabilidad térmica de cada proteína no se vio afectada por el procedimiento de purificación y complementan lo observado por dicrósmo circular, sugiriendo que ni la concentración de sal ni el pH alteran la estructura de las quimeras. La T_m promedio de las variantes fue de 60,2 °C, sin diferencias significativas entre ellas. Este valor fue significativamente superior al observado para el IFN-wt, cuya T_m fue de 57 °C (Fig. 52). Esta diferencia sugiere que la incorporación de los péptidos confiere una mayor estabilidad conformacional a la proteína nativa, probablemente debido a nuevas interacciones intra o intermoleculares que estabilizan su estructura. De este modo, los resultados indican que los péptidos representan una herramienta útil para mejorar la estabilidad térmica del hIFN nativo.

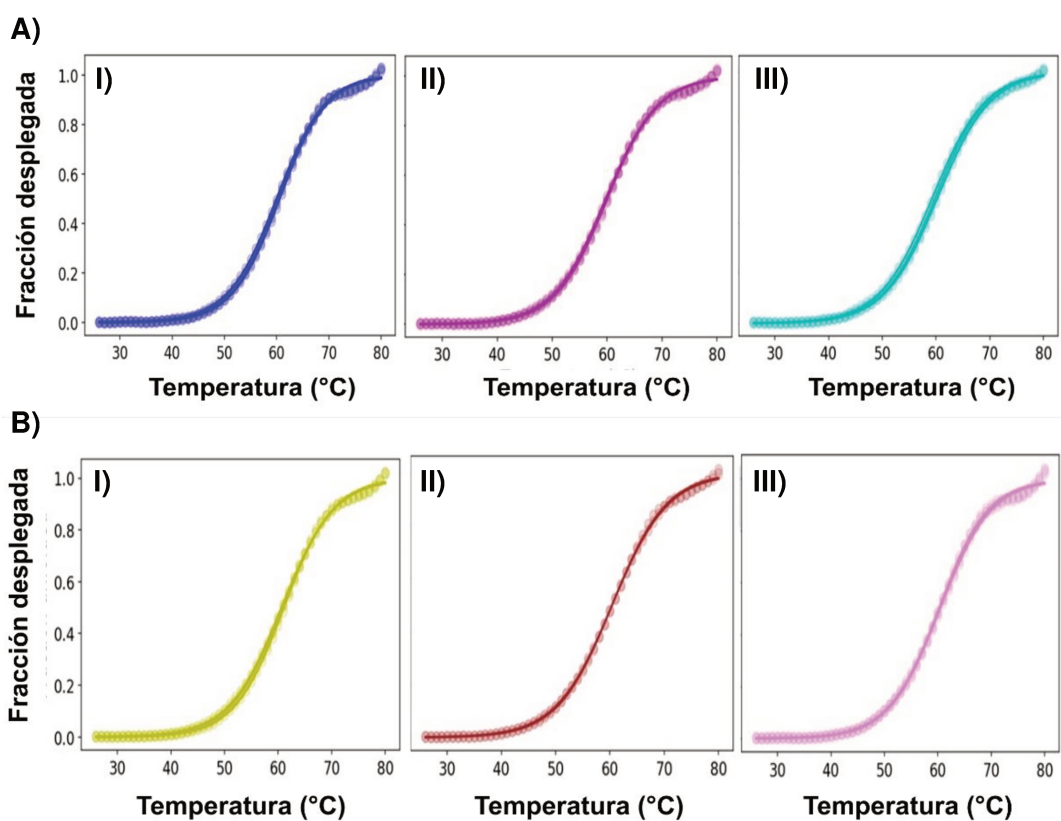


Figura 51: Thermal Shift Assay para evaluar estabilidad térmica. T_m para **A)** GMOP₃-IFN-GMOP y **B)** mGMOP₃-IFN-mGMOP purificadas por **I)** CA5E6: (60,3±0,3) °C y (60,8±0,3) °C ; **II)** CC1H7 SS: (59,8±0,5) °C y (60,3±0,2) °C; **III)** CC1H7 CS: (59,8±0,2) °C y (60,4±0,1) °C, respectivamente.

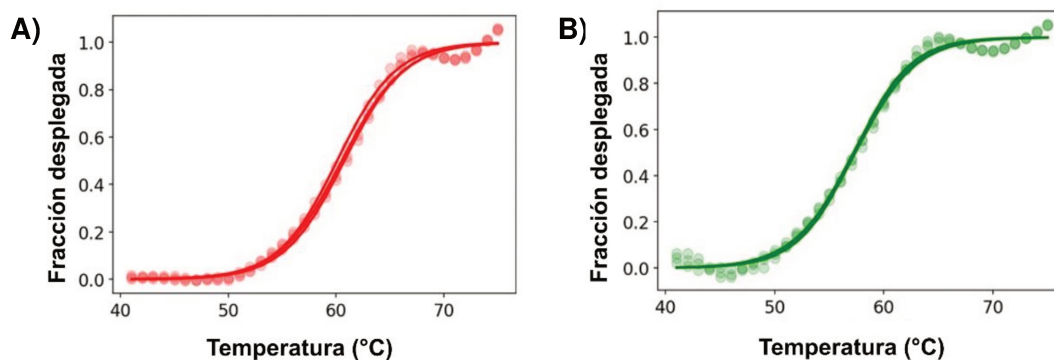


Figura 52: Thermal Shift Assay para evaluar estabilidad térmica. T_m para: **A)** IFN-NG de $(60,3 \pm 0,4)$ °C. **B)** IFN-wt de $(57,3 \pm 0,1)$ °C.

No obstante, el hecho de que el IFN-NG también presentara una T_m de ~ 60 °C obliga a considerar otros factores estructurales para explicar este comportamiento. Estudios previos han demostrado que la O-glicosilación del hIFN α -2b en el residuo Thr106 (que conecta la hélice 3 con la hélice 4) reduce la estabilidad térmica al aumentar la rigidez del *loop* y alterar interacciones hidrofóbicas internas (Johnston y col., 2011). La adición de glicanos como GalNAc o Gal(β 1,3)GalNAc en un bucle flexible disminuye la dinámica conformacional de dicha región, sugiriendo que la flexibilidad del bucle es necesaria para la estabilidad estructural. En este contexto, la rigidez impartida por el carbohidrato podría resultar perjudicial para la estabilidad global de la glicoproteína (Ghasriani y col., 2013; Mills y Chadwick, 2018). En concordancia con ello, la eliminación del glicano eliminaría las restricciones estéricas e hidrofílicas asociadas, explicando el aumento en la estabilidad observado tras la O-deglicosilación enzimática del hIFN α -2b glicosilado.

De este modo, aunque la incorporación de péptidos en nuestras variantes incrementó la estabilidad térmica respecto del IFN-wt, la persistente glicosilación en Thr106 podría actuar como factor limitante, impidiendo que alcancen una T_m superior a la del IFN-NG. Es importante destacar que, aun con esa restricción, los péptidos demostraron mejorar la estabilidad térmica relativa.

La estabilidad conformacional suele considerarse un buen indicador preliminar de vida útil y de vida media para proteínas terapéuticas. Más allá de la estabilidad térmica, múltiples factores adicionales influyen en el comportamiento *in vivo* de estas moléculas, subrayando la importancia de realizar estudios funcionales complementarios.

2.3.3. Determinación de la actividad biológica *in vitro*

Los ensayos de valoración biológica permiten estimar la capacidad de una proteína para inducir una respuesta específica. Estos datos resultan especialmente relevantes cuando se busca predecir la potencia y estabilidad del producto, proporcionando una medida funcional de su actividad biológica, en este caso vinculada a la acción *in vivo* de las citoquinas (White y col.,

2019). Los bioensayos pueden adoptar diferentes formatos, siendo los más utilizados aquellos *in vitro*, que utilizan cultivos celulares capaces de responder a la acción de la citoquina de interés. Este tipo de ensayos es particularmente útil en etapas de investigación preclínica, ya que, si bien no están diseñados para predecir o reflejar la eficacia clínica de forma directa, permiten evaluar la actividad biológica relacionada con el mecanismo de acción Guía FDA (2023).

La determinación de la ABE de las nuevas variantes de rhIFN se realizó mediante la valoración de su actividad biológica antiviral y antiproliferativa, en comparación con su contraparte no modificada (IFN-wt).

2.3.3.1. Actividad antiviral *in vitro*

El ensayo de AAV es uno de los métodos de referencia más importantes para determinar la AB de los hIFNs. Si bien se han descrito varios protocolos, el más utilizado es el ensayo de reducción del efecto citopático, que emplea como punto final la inhibición del 50% de dicho efecto para estimar la bioactividad del hIFN (Chen y col., 2018). En este trabajo, las variantes GMOP₃-IFN-GMOP y mGMOP₃-IFN-mGMOP fueron evaluadas *in vitro* en función de su capacidad para ejercer efectos antivirales sobre la línea celular MDBK en presencia del virus VSV. En primer lugar, se analizaron las muestras obtenidas mediante las distintas estrategias de purificación y, posteriormente, se combinaron en una preparación para determinar el valor final de AB. A partir de estas determinaciones y de la concentración de cada proteína, se calculó la ABE.

Para asegurar una comparación válida entre los distintos métodos de purificación, todas las curvas de AAV se generaron partiendo de la misma concentración inicial de proteína (misma masa por volumen) en el ensayo. Las Fig. 53 y 54 muestran una curva sigmoïdal representativa del ensayo de AAV correspondiente a cada quimera (A) y un gráfico de barras que compara los valores de ABE obtenidos para cada variante purificada mediante los distintos métodos (B). Bajo estas condiciones controladas, las curvas de AAV obtenidas para ambas proteínas se superpusieron completamente entre los distintos métodos de purificación. Este comportamiento, confirmado estadísticamente mediante el test de Kruskal-Wallis, indica que no se detectaron diferencias significativas en la actividad biológica atribuibles al proceso de purificación, demostrando que ninguno de los métodos evaluados afecta la funcionalidad *in vitro* de las proteínas. Por lo tanto, cualquiera de ellos puede emplearse sin comprometer la actividad biológica, siendo la purificación con el mAb CC1H7 y el agregado de Na₂SO₄ la opción más conveniente en términos de rendimiento. Además, este enfoque ofrece la ventaja de poder aplicarse a cualquier proteína fusionada a los péptidos GMOP o mGMOP.

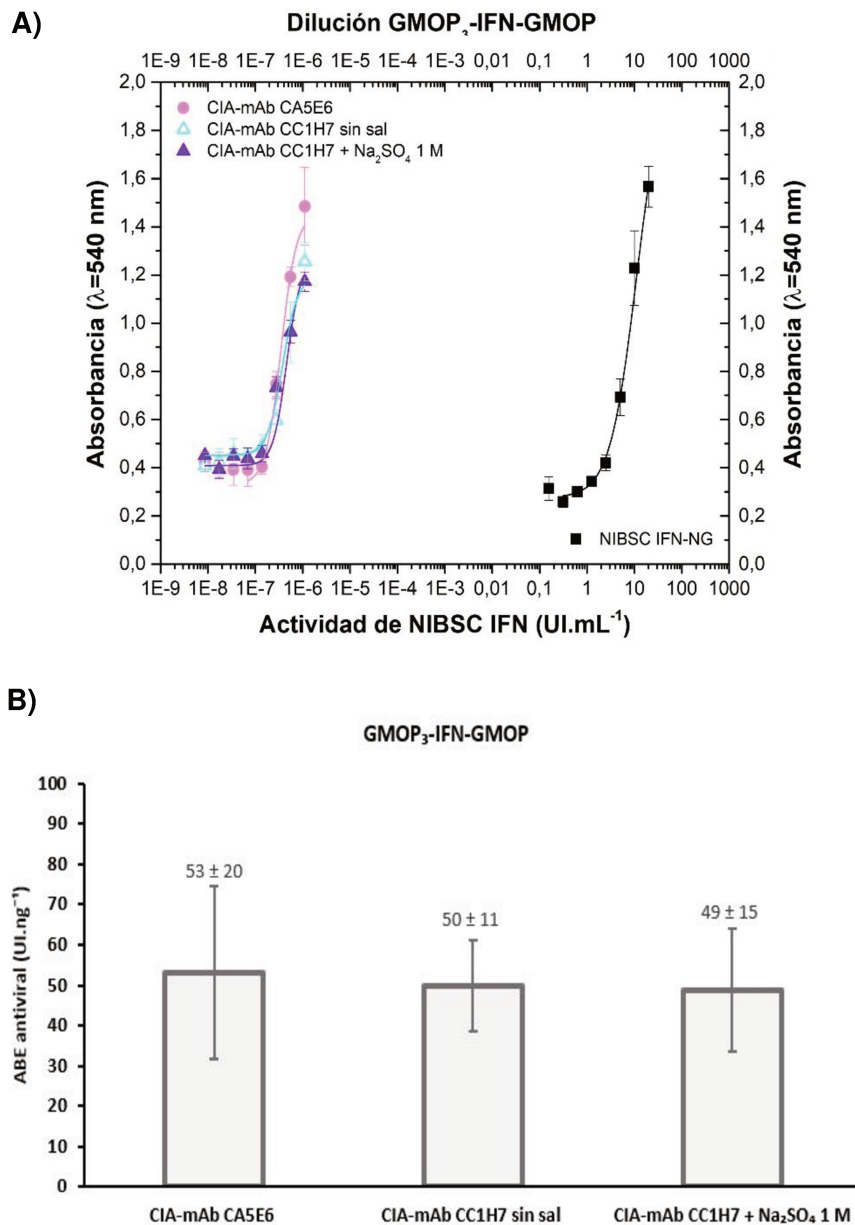


Figura 53: Ensayo de AAV de GMOP₃-IFN-GMOP obtenido mediante distintos métodos de purificación. A) Curvas dosis-respuesta representativas del ensayo de AAV. **B)** Gráfico de barras que compara los valores de ABE determinados a partir de 8 réplicas independientes. No se observaron diferencias significativas entre los métodos de purificación (test de Kruskal-Wallis).

En función de la consistencia observada en los valores de AAV entre los distintos métodos de purificación, las proteínas obtenidas por cada uno de ellos fueron agrupadas para obtener una única muestra representativa de cada muteína. En estas condiciones, se evaluó nuevamente la AAV de cada variante y se la comparó con la del IFN-wt (Fig. 55).

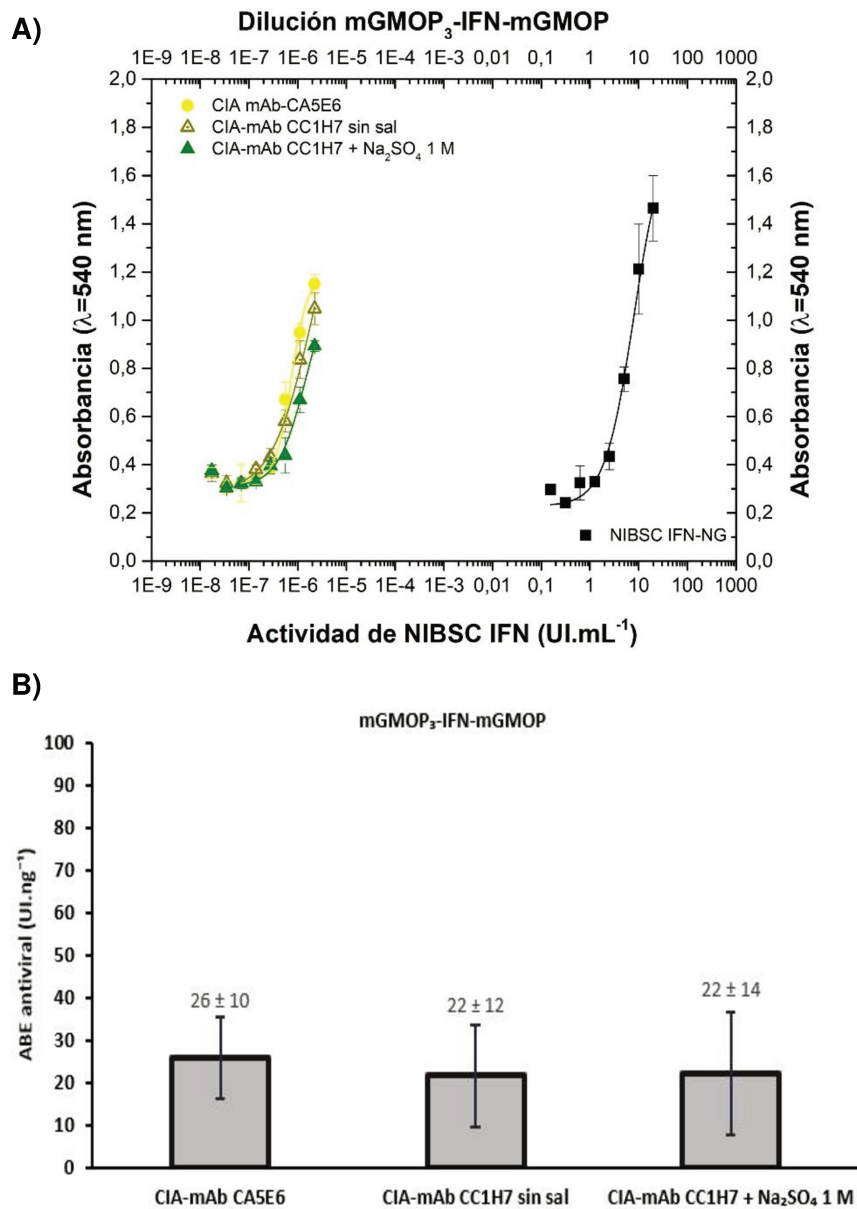


Figura 54: Ensayo de AAV de mGMOP₃-IFN-mGMOP obtenido mediante distintos métodos de purificación. A) Curvas dosis-respuesta representativas del ensayo de AAV. **B)** Gráfico de barras que compara los valores de ABE determinados a partir de 8 réplicas independientes. No se observaron diferencias significativas entre los métodos de purificación (test de Kruskal-Wallis).

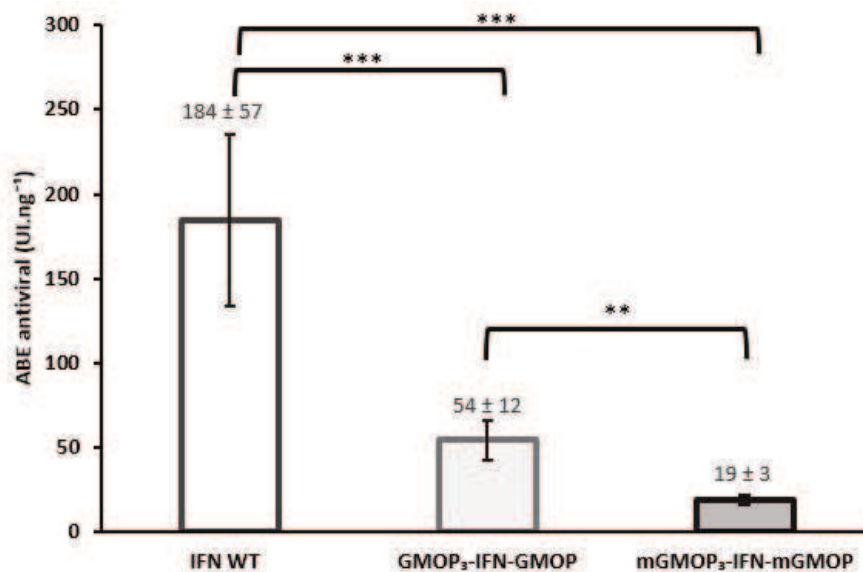


Figura 55: ABE antiviral de las variantes, determinada en la muestra generada a partir de la combinación de las proteínas purificadas mediante los distintos métodos. El gráfico muestra el promedio de los resultados obtenidos en cuatro ensayos independientes \pm SD en comparación con el IFN-wt. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas: ** para $p < 0,01$ y *** para $p < 0,001$.

A diferencia de las variantes de rhIFN que incorporan una sola copia del péptido, las cuales no demostraron diferencias significativas en la AAV con respecto del IFN-wt ni entre sí, el agregado de múltiples copias de las etiquetas en ambos extremos de la proteína dio lugar a diferencias significativas entre todas las proteínas evaluadas. Los resultados obtenidos mostraron una disminución de la ABE de GMOP₃-IFN-GMOP y mGMOP₃-IFN-mGMOP con respecto al IFN-wt, conservando aproximadamente el 30% y 10% de la ABE antiviral, respectivamente. Esto sugiere que la adición de una única copia del péptido no altera sustancialmente la interacción con el receptor, mientras que el incremento en el número de copias y, por ende, en el contenido de O-glicanos, ejerce un efecto más marcado sobre dicha interacción. A su vez, la mayor densidad de O-glicanos asociada al péptido mGMOP en comparación con GMOP podría potenciar este efecto cuando se incorporan múltiples copias, dando lugar a diferencias entre las variantes que no se manifiestan en aquellas que contienen una sola copia del péptido. En concordancia con estas observaciones, las diferencias también se reflejaron en el contenido de ácido siálico, que resultó significativamente mayor en las variantes con cuatro copias de los péptidos respecto de aquellas que presentan una sola. La disminución progresiva de la AB al incrementar el contenido de O-glicanos podría deberse a una disminución en la afinidad de unión al receptor, producto de un efecto de repulsión electrostática entre las cargas negativas aportadas por las moléculas de ácido siálico y el receptor. Este fenómeno ha sido reportado previamente en numerosas publicaciones, donde se ha demostrado que ciertas glicoproteínas con alto contenido de ácido siálico presentan una menor potencia *in vitro* en comparación con aquellas menos sialiladas (Egrie y Browne, 2001; Perlman y col., 2003). La rhEPO constituye

un caso emblemático de esta regla, ya que se ha comprobado que el aumento del contenido de ácido siálico disminuye directamente su actividad *in vitro* (Elliott y col., 2003; Goto y col., 1988). No obstante, es importante destacar que estas observaciones corresponden a ensayos *in vitro* y no necesariamente se traducen en una menor eficacia *in vivo*. En efecto, se ha demostrado que la desialilación enzimática de rhEPO aumenta su afinidad de unión al receptor; sin embargo, su actividad *in vivo* se reduce drásticamente (Hessefort y col., 2021). De manera similar, Zhang y col. (2020) reportaron el desarrollo de dos moléculas de hIFN fusionadas a una y dos copias de un péptido CTP modificado (con cuatro O-glicosilaciones naturales y cuatro N-glicosilaciones adicionales por péptido). Tales moléculas mostraron una disminución del 85 y 95% en su AAV, respectivamente, en comparación con el IFN-wt. No obstante, ambas exhibieron una vida media en circulación considerablemente mayor. En nuestro laboratorio, la variante IFN4N, generada a partir de la incorporación de cuatro sitios potenciales de N-glicosilación, conservó sólo entre un 10% y un 20% de la ABE antiviral de la proteína nativa. Sin embargo, su vida media en circulación aumentó 25 veces en comparación con el IFN-NG, superando incluso la de su derivado comercial pegilado, Intron-A PEG (Ceaglio y col., 2010; Gugliotta y col., 2017). Estos antecedentes sugieren que la reducción de la actividad *in vitro* observada para las variantes estudiadas podría estar compensada por mejoras en su comportamiento farmacocinético, lo que resalta la importancia de evaluar estos parámetros de manera integral.

2.3.3.2. Actividad antiproliferativa *in vitro*

Los IFN son citoquinas esenciales en la respuesta inmune, conocidas por sus efectos antivirales, inmunomoduladores y antiproliferativos. Esta última propiedad ha sido ampliamente estudiada en el desarrollo de terapias antitumorales y en enfermedades autoinmunes, donde el control de la proliferación celular representa un objetivo terapéutico relevante (Loignon y col., 2008).

En este trabajo se evaluó la AAP *in vitro* de las variantes de rhIFN en células Daudi, con el objetivo de analizar su potencia biológica y el impacto del agregado de las etiquetas peptídicas con sitios de potencial O-glicosilación.

En primer lugar, se analizó el impacto de los distintos métodos de purificación sobre ambas proteínas (Fig. 56 y 57). Al igual que en el ensayo de AAV, las curvas obtenidas para las variantes GMOP₃-IFN-GMOP y mGMOP₃-IFN-mGMOP se superpusieron, indicando una ABE comparable independientemente del método de purificación empleado. Estos resultados sugieren que las proteínas mantienen su actividad incluso luego de ser sometidas a condiciones de alta salinidad y pH. Esta estabilidad podría estar asociada a la presencia de los péptidos, ya que se ha reportado que la incorporación de secuencias cortas o anfipáticas en los extremos

de proteínas puede contribuir a mejorar su solubilidad, estabilidad térmica y actividad incluso frente a condiciones desfavorables (Liu y col., 2022).

Siguiendo el mismo criterio aplicado para AAV, luego de confirmar la conservación de la ABE, las variantes fueron agrupadas en una única preparación, determinándose la ABE en comparación con el IFN-wt (Fig. 58).

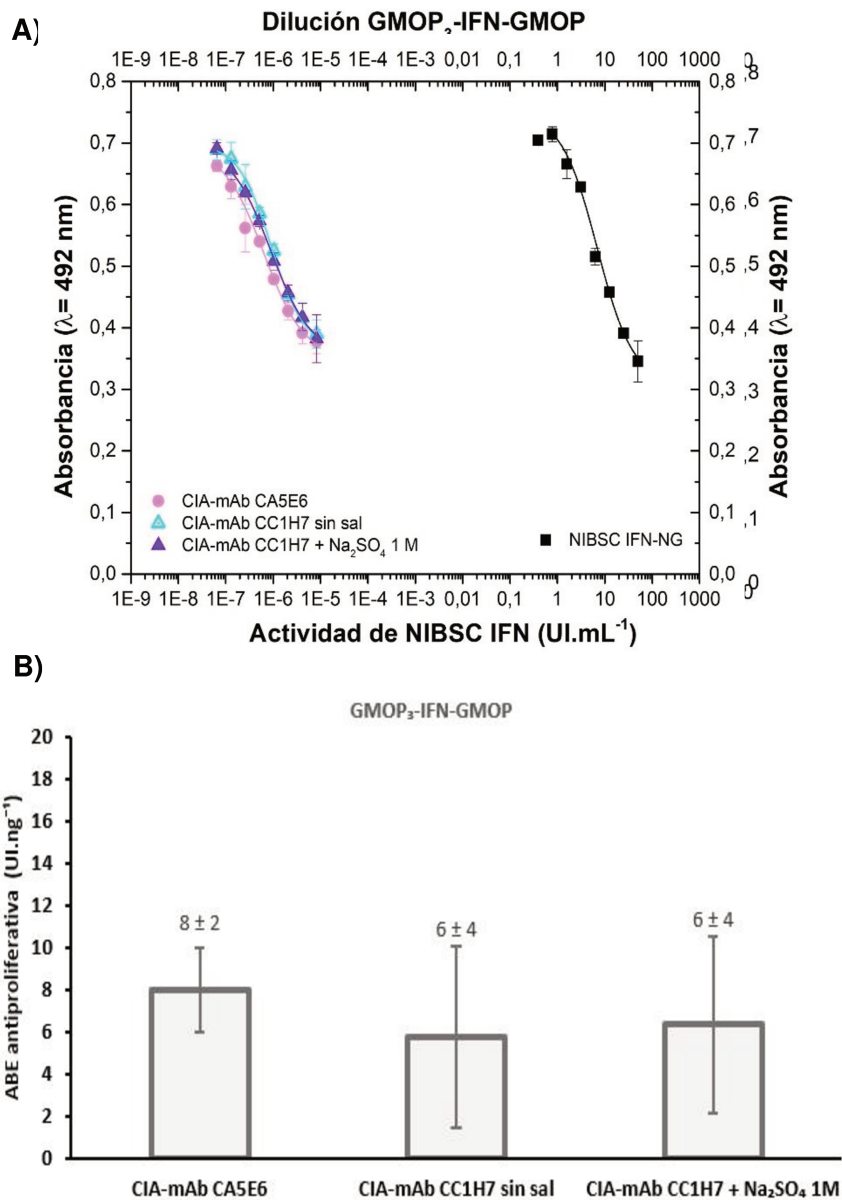


Figura 56: Ensayo de AAP de GMOP₃-IFN-GMOP obtenido mediante distintos métodos de purificación. A) Curvas dosis-respuesta representativas del ensayo de AAP. B) Gráfico de barras que compara los valores de ABE determinados a partir de 8 réplicas independientes. No se observaron diferencias significativas entre los métodos de purificación (test de Kruskal-Wallis).

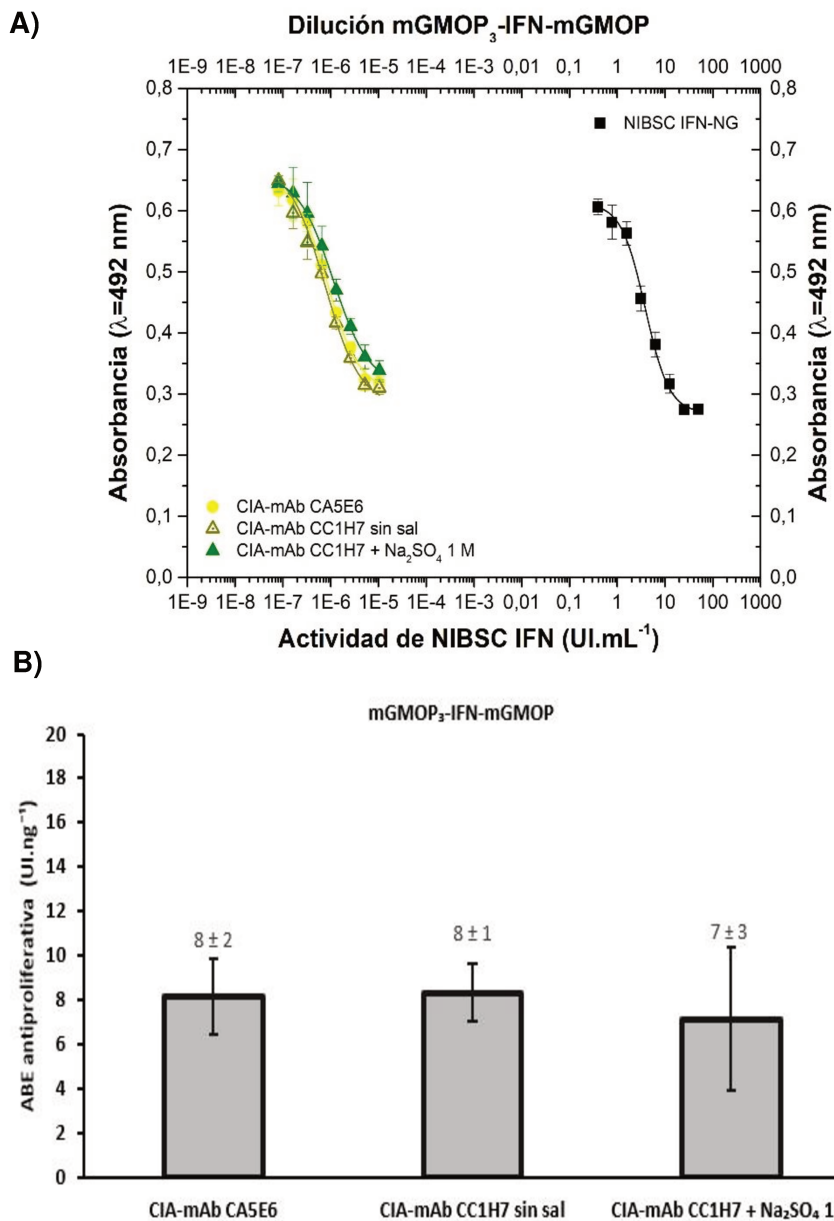


Figura 57: Ensayo de AAP de mGMOP₃-IFN-mGMOP obtenido mediante distintos métodos de purificación. A) Curvas dosis-respuesta representativas del ensayo de AAP **B)** Gráfico de barras que compara los valores de ABE determinados a partir de 8 réplicas independientes. No se observaron diferencias significativas entre los métodos de purificación (test de Kruskal-Wallis).

Ambas variantes mostraron una marcada disminución en la AAP en comparación con la molécula de referencia, lo que sugiere que la presencia de los péptidos y las modificaciones glicosídicas ejercieron un mayor impacto sobre esta actividad que sobre la AAV. Ambas moléculas conservaron aproximadamente un 4% de la actividad *in vitro* del IFN-wt. Una tendencia similar fue observada para el IFN-4N, que conservó entre un 2% y 3% de la AAP respecto al IFN-wt sin modificar. Sin embargo, como se mencionó previamente, esta variante presentó un tiempo de vida media mayor y un *clearance* 20 veces menor que se tradujo en una actividad antitumoral *in vivo* superior (Ceaglio y col., 2010; Gugliotta y col., 2017).

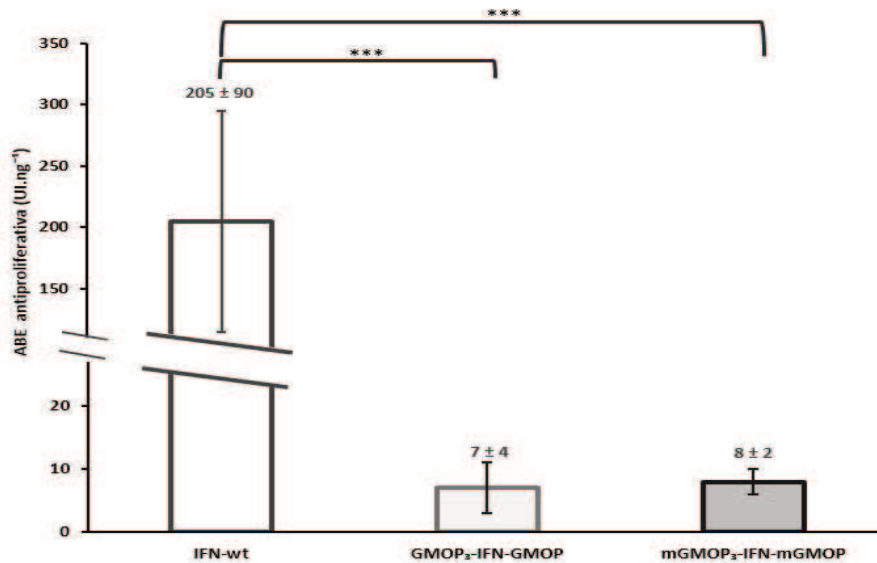


Figura 58: ABE antiproliferativa de las variantes con los péptidos en comparación con IFN-wt. El gráfico muestra el promedio de los resultados obtenidos en cuatro ensayos independientes \pm SD. Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas: *** ($p < 0,001$).

Si bien la presencia de los distintos péptidos produjo diferencias significativas en la AAV de las variantes, no se observaron diferencias significativas en la AAP. En estudios previos realizados en el laboratorio, se detectaron diferencias significativas en la AAP entre GMOP-IFN y mGMOP-IFN, conservando un 70% y un 23% de la actividad del rhIFN de referencia, respectivamente (Sales y col., 2021). En este caso, la incorporación de un mayor número de copias de los péptidos podría generar un impedimento estérico tal que provoque una disminución global de la AB, de tal magnitud que las diferencias entre las variantes asociadas a la glicosilación dejen de ser detectables. Es posible que, dado que ambas moléculas ya presentan un alto grado de glicosilación, la incorporación de grupos glicosídicos adicionales no genere cambios funcionales detectables *in vitro*. En otras palabras, la actividad podría disminuir progresivamente con el aumento de la glicosilación hasta alcanzar un umbral funcional, a partir del cual nuevas modificaciones no producirían un efecto adicional debido a una limitación intrínseca del sistema. Una vez alcanzado este umbral, el impacto funcional tendería a estabilizarse, de modo que las diferencias entre variantes con glicosilaciones adicionales resultarían irrelevantes para ciertas funciones, como en este caso la actividad antiproliferativa. Este comportamiento ha sido descrito en otras proteínas. Por ejemplo, en TIMP-1 la doble glicosilación (dos sitios ocupados) se asoció con una mayor actividad promotora de proliferación tumoral, mientras que la ocupación de un sitio adicional no necesariamente implica un cambio proporcional en la función, sugiriendo la existencia de un “techo” funcional (Häußler y col., 2025).

A su vez, la reducción más pronunciada en la AAP con respecto al rhIFN de referencia podría deberse a diferencias en los requerimientos de afinidad necesarios para activar las vías de

señalización. La respuesta antiviral se inicia mediante interacciones transitorias de baja afinidad con el complejo receptor IFNAR1/IFNAR2, mientras que la actividad antiproliferativa requiere la formación de un complejo ternario estable, sostenido por interacciones de alta afinidad (Ghislain y col., 1995; Thomas y col., 2011). En particular, la afinidad diferencial del hIFN- α 2 por cada subunidad del receptor condiciona la activación específica de las vías que conducen a sus distintas funciones biológicas, siendo la AAP especialmente sensible a alteraciones en la unión con IFNAR1, subunidad clave para estabilizar el complejo ternario que desencadena la inhibición del crecimiento celular (Jaitin y col., 2006; Jaks y col., 2007; Roisman y col., 2005). Esta disminución en la afinidad *in vitro* podría ser compensada *in vivo* por el incremento en la vida media plasmática, ya que las proteínas terapéuticas sialiladas se degradan más lentamente y presentan una eliminación retardada. Esto se debe a que los residuos de galactosa quedan enmascarados por el ácido siálico terminal, evitando el reconocimiento por el receptor asialoglicoproteico de los hepatocitos, responsable de su depuración (Lin y col., 2015). Pese a la disminución observada en la actividad *in vitro*, las isoformas más ácidas de estas moléculas mostraron un incremento en su actividad biológica *in vivo* como consecuencia de su mayor vida media plasmática. Estos hallazgos sugieren que las nuevas variantes podrían exhibir un comportamiento similar, con una vida media prolongada y un perfil prometedor para su desarrollo como candidatos bioterapéuticos.

2.3.3.3. Estabilidad plasmática

Numerosos factores afectan la estabilidad de las proteínas, entre ellos la temperatura, el pH, la fuerza iónica y la susceptibilidad a la degradación por proteasas, disminuyendo su actividad biológica y, en consecuencia, su eficacia terapéutica.

El rhIFN- α 2b puede ser administrado por vía subcutánea, endovenosa o intramuscular, presentando diferentes perfiles farmacocinéticos. Independientemente de la vía empleada, la citoquina es rápidamente inactivada y eliminada del plasma a las pocas horas desde su administración. Entre los mecanismos ya anteriormente descritos en el proceso de inactivación y eliminación, se incluyen la proteólisis mediada por proteasas séricas (Peleg-Shulman y col., 2004; Shechter y col., 2001). De este modo, la presencia de glicanos en las variantes desarrolladas podría conferir resistencia a la degradación proteolítica. Para evaluar este aspecto, se analizó la estabilidad de las muteínas en comparación con el IFN-wt, mediante incubación en plasma humano a 37 °C, a fin de reproducir condiciones similares a las fisiológicas. Se emplearon unidades de actividad equivalente de las tres proteínas y se tomaron muestras a distintos tiempos de incubación. El porcentaje de AAV remanente respecto a la AAV inicial se graficó en función del tiempo transcurrido desde el comienzo del ensayo hasta las 168 h (Fig. 59).

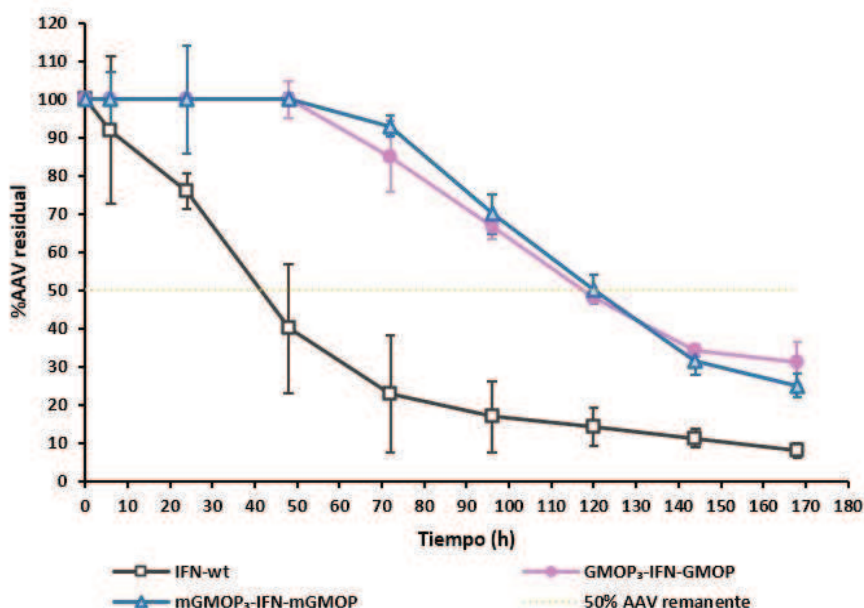


Figura 59: Estabilidad de las variantes de rhIFN en plasma humano. Se muestra el porcentaje de AAV remanente en función del tiempo de incubación. Las barras de error corresponden a la desviación estándar del ensayo de validación biológica antiviral (n=3). No se realizaron réplicas independientes del ensayo.

Bajo las condiciones ensayadas, las variantes hiper-O-glicosiladas mostraron una disminución más lenta de la AAV, conservando cerca del 30 % de actividad luego de 168 h de incubación, en contraste con el IFN-wt, que retuvo solo un 8% de su actividad inicial. Además, el IFN-wt perdió el 50% de su actividad a las 39 ± 10 h, mientras que las variantes lo hicieron mucho más tarde (113 ± 19 h en el caso de GMOP₃-IFN-GMOP y 120 ± 10 h para mGMOP₃-IFN-mGMOP), mostrando así una resistencia a la degradación aproximadamente tres veces superior.

Estos resultados conciben con estudios previos realizados con la variante IFN-4N, cuya potencia se redujo en menor medida que el IFN-NG utilizado como control, conservando más del 60% de su actividad luego de 96 h de incubación. La mayor estabilidad fue atribuida a la presencia de oligosacáridos N-unidos, ya que la N-deglicosilación de la proteína condujo a un perfil de actividad residual similar al del IFN-NG. De manera similar, una estabilidad comparable se observó con el Intron-A PEG, que mantuvo aproximadamente un 65% de actividad al finalizar la incubación (Ceaglio y col., 2010).

La velocidad de inactivación en plasma obtenida a partir de la pendiente de la fase lineal de la curva de actividad remanente en función del tiempo también reforzó estos hallazgos. Para el IFN-wt, esta tasa fue significativamente mayor ($1,2 \pm 0,2\%.h^{-1}$) que la de las variantes hiper-O-glicosiladas ($0,67 \pm 0,04\%.h^{-1}$ para GMOP₃-IFN-GMOP y $0,70 \pm 0,07\%.h^{-1}$ para mGMOP₃-IFN-mGMOP), lo que sugiere que la glicosilación conferiría una mayor resistencia a la inactivación por proteasas plasmáticas a temperatura fisiológica. Probablemente, la magnitud de la estabilización esté relacionada con el número de glicanos unidos, su extensión, contenido de antenas y cargas de sus residuos terminales. Por consiguiente, este efecto podría estar

influenciado tanto por repulsiones estéricas como electrostáticas inducidas por los glúcidos presentes en la superficie proteica, generando un impedimento estérico y un enmascaramiento de los sitios de corte (Solá y Griebenow, 2010). Esta protección podría tener una influencia positiva sobre la farmacocinética de ambas citoquinas, contribuyendo a prolongar su vida media en circulación.

Diversas tecnologías han sido aplicadas con el fin de mejorar la resistencia del rhIFN- α 2b a la proteólisis. La pegilación, por ejemplo, reduce la velocidad de degradación, como demostraron (Lee y col., 2007) al mono-PEGilar IFN-NG con PEG de 5 kDa, obteniendo una constante de velocidad de degradación menor, sugiriendo mejoras aún mayores con moléculas de PEG de mayor MM. Otra técnica empleada es la fusión a dominios Fc de inmunoglobulinas, como en el caso de IFN- α /Fc, que prolongó la vida media del rhIFN y aumentó su estabilidad frente a enzimas séricas (Jia y col., 2016). También se ha utilizado la conjugación con ácidos polisacálicos, polímeros de ácido N-acetilneuramínico, para proteger proteínas frente a la digestión proteolítica, aplicándose exitosamente a enzimas como la asparaginasa o la catalasa (Gregoriadis y col., 2000). Todas estas modificaciones buscan crear una barrera estérica que dificulte el acceso de las proteasas a sitios susceptibles de corte sobre la superficie del hIFN.

2.3.3.4. Estabilidad térmica

La temperatura es el principal factor que afecta la estabilidad de las proteínas de uso terapéutico. En general, a medida que aumenta la temperatura, disminuye la estabilidad de la molécula. Luego de la exposición al calor, la estructura secundaria y terciaria de una proteína puede cambiar o formar agregados, lo que conduce a una pérdida irreversible de su AB (Arakawa y col., 2001). En este contexto, la glicosilación también ha sido descrita como una estrategia para mejorar la estabilidad térmica y cinética de las proteínas. Diferentes estudios que comparan la estabilidad de proteínas en sus formas glicosiladas y no glicosiladas demostraron que los glicanos influyen en la cinética del plegamiento y confieren una mayor estabilidad termodinámica a las variantes glicosiladas (Manning y col., 2010; Shental-Bechor y Levy, 2008).

El comportamiento térmico de las variantes de rhIFN se estudió en comparación con el IFN-wt mediante incubación a diferentes temperaturas (desde 20 °C hasta 95 °C) durante 10 min, determinándose la AAV remanente de cada proteína (Fig. 60).

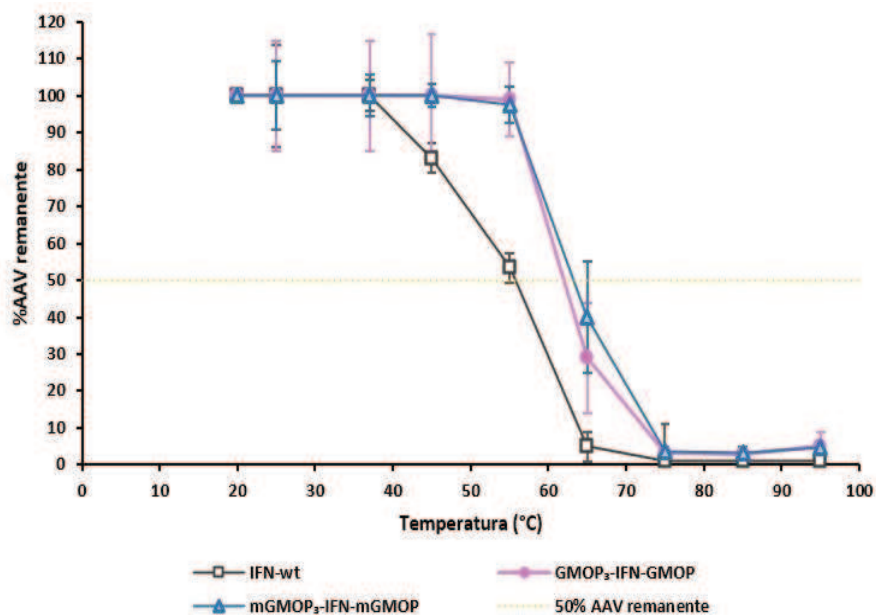


Figura 60: Estabilidad térmica de las variantes de rhIFN. Se muestra el porcentaje de AAV remanente en función del tiempo de incubación. Las barras de error corresponden a la desviación estándar del ensayo de valoración biológica antiviral (n=3). No se realizaron réplicas independientes del ensayo.

En el rango de temperaturas de incubación entre 20 °C y 40 °C, las tres proteínas conservaron, en promedio, el 100% de la AAV. A partir de los 40 °C, el porcentaje de AAV remanente del IFN-wt comenzó a disminuir, alcanzando un valor mínimo a los 65 °C. En cambio, las variantes conservaron el 100% de su actividad hasta los 55 °C, valor a partir del cual el porcentaje de AAV remanente disminuyó rápidamente hasta estabilizarse en un 5% a partir de los 75 °C.

Como se mencionó anteriormente, el incremento de la estabilidad térmica se refleja en el aumento de la T_m , definida como la temperatura a la cual se observa una pérdida del 50% de la AB. En este sentido, el 50% de la AAV remanente para IFN-wt se alcanzó a los 57 ± 1 °C, mientras que, para las variantes, cuyas curvas se desplazaron hacia temperaturas más elevadas, las T_m fueron de 61 ± 2 °C para GMOP₃-IFN-GMOP y 62 ± 2 °C para mGMOP₃-IFN-mGMOP. Estos valores coinciden con los obtenidos mediante *Thermal Shift*, lo que refuerza la consistencia del análisis.

Por lo tanto, la incorporación de O-glicanos podría proteger a las variantes frente a la inactivación térmica, aumentando su estabilidad en comparación con el IFN-wt. Además, la localización de los sitios de O-glicosilaciones podría contribuir a este efecto, dado que en estas variantes los glicanos se encuentran mayoritariamente en los extremos peptídicos y no en regiones internas de la proteína, lo que minimizaría posibles interferencias en el plegamiento nativo y favorecería el efecto estabilizante.

El aumento de la estabilidad térmica es un fenómeno ampliamente reportado en glicoproteínas y depende principalmente del contenido total de carbohidratos, más que del tipo de enlace o de la estructura del glicano (Solá y col., 2007). En general, los estudios comparativos entre formas

glicosiladas y no glicosiladas de glicoproteínas indican que los azúcares mejoran la estabilidad termodinámica, aunque sus efectos sobre la cinética de plegamiento pueden ser variables. Por ejemplo, Solá y Griebenow (2010) observaron que la glicosilación química de α -quimotripsina produjo un aumento de la T_m proporcional al número de glicanos incorporados. De manera similar, un estudio *in silico* realizado por Shental-Bechor y Levy (2008) encontró que tanto el número como la ubicación de los glicanos en el dominio SH3 afectan la estabilidad térmica y el mecanismo de plegamiento, observando un incremento de 0,6 a 0,9 °C en la T_m por cada glicano añadido, independientemente de su tamaño. No obstante, también se observó que determinadas posiciones pueden provocar desestabilización, destacando la importancia crítica de la ubicación del glicano en el efecto estabilizante. En este estudio, el dominio SH3 empleado corresponde a un sistema modelo, en el cual los glicanos incorporados son polisacáridos sintéticos unidos artificialmente (no glicosilación N u O natural), por lo que el efecto observado depende críticamente del sitio de conjugación.

Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con lo reportado en la literatura, postulando que tanto el contenido como la ubicación de los O-glicanos pueden modular la estabilidad térmica de proteínas terapéuticas.

2.3.4. Farmacocinética en animales de experimentación

El efecto de la glicosilación en las proteínas terapéuticas ha cobrado gran relevancia debido a su reconocida influencia sobre las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, siendo un factor clave en la determinación de su eficacia clínica (Chia y col., 2023). En particular, la vida media en circulación de las proteínas terapéuticas recombinantes constituye un atributo farmacocinético fundamental, ya que determina la frecuencia de administración, impactando directamente en el costo del tratamiento y en la calidad de vida de los pacientes (Rondon y col., 2021).

Con el objetivo de analizar la influencia de los O-glicanos aportados por los péptidos GMOP y mGMOP a nivel farmacocinético, se evaluaron los perfiles farmacocinéticos de las variantes de fusión de rhIFN en comparación con el IFN-wt. Para ello, se administró a ratas Wistar por vía subcutánea una dosis (expresada en unidades de AAV) de cada variante y del IFN-wt. La cuantificación de las variantes en el plasma recolectado a los distintos tiempos post-inyección se llevó a cabo mediante la determinación de la AAV *in vitro*, lo que permitió medir exclusivamente la fracción activa de la proteína. En la Fig. 61 se muestran los perfiles farmacocinéticos obtenidos para cada proteína.

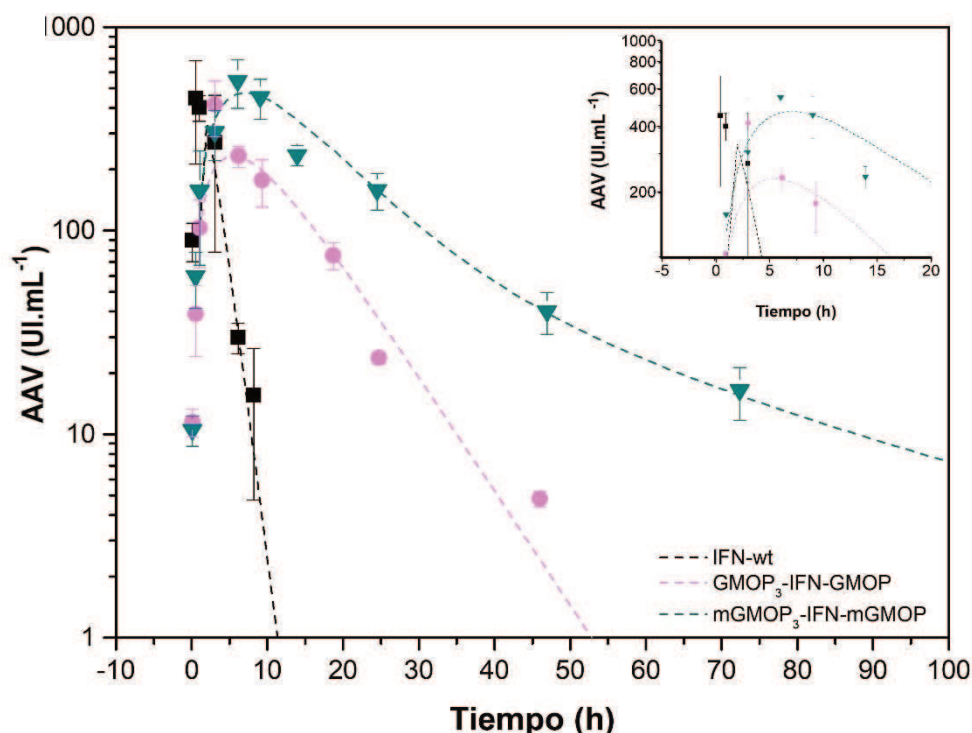


Figura 61: Perfil farmacocinético de las variantes O-glicosiladas de rhIFN inoculadas en animales de experimentación. Se graficó la actividad biológica antiviral plasmática del IFN-wt, GMOP₃-IFN-GMOP y mGMOP₃-IFN-mFMOP en función del tiempo transcurrido desde la inyección. Los resultados muestran el valor promedio \pm SD (n=4). En la parte superior se observa una ampliación de los picos de actividad biológica a cada uno de los tiempos correspondientes.

El comportamiento farmacocinético de las proteínas fue modelado ajustando los datos a un modelo sin retardo y con absorción de primer orden para IFN-wt y GMOP₃-IFN-GMOP, mientras que para mGMOP₃-IFN-mGMOP se aplicó un modelo de tránsito con absorción de primer orden, tras su inoculación subcutánea. En todos los casos, se asumió una distribución en un único compartimento y una eliminación lineal de primer orden. A partir de los modelos seleccionados, se calcularon los parámetros farmacocinéticos (Tabla 17), los cuales fueron comparados mediante el test de Kruskal-Wallis para evaluar la existencia de diferencias significativas entre muestras ($p \leq 0,01$).

Tabla 17: Parámetros farmacocinéticos de las variantes de rhIFN luego de la inyección subcutánea en ratas

	T_{Máx} (h)	C_{Máx} (UI.mL ⁻¹)	t_{1/2} elim. (h)	AUC (UI.h.mL ⁻¹)	Cl_{app} (mL.h ⁻¹)
IFN-wt	1,2 \pm 0,1 ^A	471 \pm 84 ^A	0,9 \pm 0,1 ^A	1536 \pm 379 ^A	136 \pm 25 ^A
GMOP₃-IFN-GMOP	5,4 \pm 0,1 ^B	245 \pm 55 ^B	5,5 \pm 0,2 ^B	3792 \pm 874 ^B	55 \pm 12 ^B
mGMOP₃-IFN-mGMOP	6,3 \pm 0,7 ^C	437 \pm 27 ^A	12 \pm 1 ^C	10461 \pm 359 ^C	19 \pm 1 ^C

Los parámetros fueron calculados para cada animal y se expresan como el valor promedio \pm SD (n=8). Las letras diferentes dentro de la misma columna (A, B y C) representan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p < 0,05$).

La actividad biológica máxima en plasma ($C_{m\acute{a}x}$) del IFN-wt se alcanzó a las $1,2 \pm 0,1$ h postinyección, mientras que en los análogos hiperglicosilados se registró a tiempos significativamente mayores. Esto sugiere una absorción más lenta atribuible a la presencia de residuos O-glicosilados, que reducirían la velocidad de difusión desde el sitio de inyección hacia la circulación sistémica.

El tiempo de vida media de eliminación ($t_{1/2}$) aumentó aproximadamente 6 y 13 veces para GMOP₃-IFN-GMOP y mGMOP₃-IFN-mGMOP, respectivamente, en comparación con el IFN-wt, presentando diferencias estadísticamente significativas entre todas las muestras ($p < 0,01$). La actividad plasmática del IFN-wt fue indetectable a partir de las 8 h postinyección, mientras que las variantes O-glicosiladas pudieron ser detectadas hasta las 48 h (GMOP₃-IFN-GMOP) y 72 h (mGMOP₃-IFN-mGMOP).

La velocidad de depuración plasmática o *clearance* (Cl o Cl_{app}) se redujo aproximadamente 2,5 y 7 veces para GMOP₃-IFN-GMOP y mGMOP₃-IFN-mGMOP, respectivamente, en comparación con IFN-wt, en concordancia con el incremento del área bajo la curva de concentración versus tiempo (AUC), observándose diferencias significativas entre todas las variantes ($p < 0,001$).

Estos hallazgos respaldan que la forma nativa del hIFN- $\alpha 2b$ presenta un perfil farmacocinético de proteínas de baja MM con escasa glicosilación: absorción rápida tras la liberación en el sitio de inyección y eliminación acelerada, principalmente por filtración glomerular, aunque también por interacción con receptores o proteólisis. Por el contrario, la incorporación de carbohidratos mejora sus propiedades farmacocinéticas, disminuyendo tanto la velocidad de absorción como la tasa de eliminación. Ambas variantes conteniendo los péptidos GMOP y mGMOP mostraron una mayor exposición sistémica (AUC) que el IFN-wt, siendo mGMOP₃-IFN-mGMOP el que presentó un efecto aún superior con respecto al observado para GMOP₃-IFN-GMOP. Estas diferencias pueden atribuirse a la mayor MM y a la heterogeneidad de isoformas tanto en carga como en estructura de los glicanos unidos.

La reducción del *clearance* plasmático observado en ambas proteínas de fusión puede explicarse por diversos mecanismos complementarios. En primer lugar, el incremento en el tamaño molecular debido a la adición de glicanos (40–46 kDa en las variantes frente a 21 kDa del IFN-wt) y el aumento de la carga negativa aportada por los residuos de ácido siálico (9–12 veces mayor que en el IFN-wt) limita la permeabilidad a través del filtro glomerular, tanto por restricción física como por repulsión electroestática con la matriz glomerular rica en glicosaminoglicanos cargados negativamente (Mahmood y Green, 2005). En segundo lugar, los hidratos de carbono actúan como barrera estérica que enmascara los sitios de clivaje proteolítico, protegiendo a la proteína frente a la degradación plasmática (Jenkins y Curling, 1994). Esto fue confirmado mediante el ensayo de estabilidad en plasma humano, donde las

moléculas con mayor contenido de carbohidratos mostraron una mayor resistencia a la degradación.

Cabe destacar el efecto acumulativo de la glicosilación en función del número y tipo de péptido añadido. La fusión de una sola etiqueta (GMOP o mGMOP) triplicó la vida media del hIFN (Sales y col., 2021) mientras que la incorporación de múltiples etiquetas incrementó significativamente su permanencia en circulación (6 veces para GMOP₃-IFN-GMOP y 13 veces para mGMOP₃-IFN-mGMOP). Por otra parte, la fusión de una única etiqueta no evidenció diferencias significativas entre GMOP-IFN y mGMOP-IFN, a pesar de que el péptido mGMOP contiene dos sitios adicionales de O-glicosilación. En cambio, bajo condiciones de hiperglicosilación, las diferencias fueron significativas, observándose un incremento de aproximadamente 2 veces en el $t_{1/2}$ de eliminación y una reducción de alrededor de 3 veces en el Cl_{app} para la variante con mayor número de sitios de O-glicosilación.

Estos resultados son consistentes con estudios previos en los cuales se fusionó el péptido CTP (derivado de la hCG) que cuenta con cuatro sitios potenciales de O-glicosilación, a la secuencia de diferentes proteínas para prolongar su vida media y reducir su eliminación. En este contexto, Klein y col. (2002) lograron duplicar la vida media en circulación de la FSH humana (hFSH) y disminuir su *clearance* al fusionar el CTP entre las secuencias de las subunidades β y α de la hormona. Resultados similares se observaron al aplicar una o varias repeticiones de este péptido a otras moléculas como hEPO, hGH e hIFN- α 2b, alcanzando en todos los casos una mejora significativa en sus perfiles farmacocinéticos en comparación con las moléculas nativas (Ceaglio y col., 2016; Fares y col., 2007; J. Klein y col., 2002). Más recientemente, la modificación del péptido CTP mediante la incorporación de un sitio de N-glicosilación dio lugar a la secuencia CTPON, que permitió mejorar aún más las propiedades farmacocinéticas de las proteínas de fusión (Yuan y col., 2018). En particular, la unión de una y dos secuencias CTPON al IFN- α 2b incrementó su vida media a 3 y 4 h, respectivamente, en comparación con el rhIFN- α 2b utilizado como estándar, que presentó una vida media de 1,3 h (Zhang y col., 2020). En conjunto, estos resultados destacan el impacto de la incorporación de múltiples péptidos GMOP o mGMOP, los cuales demostraron prolongar la exposición sistémica, reducir la depuración plasmática y extender la vida media en comparación con el IFN-wt.

Aunque los péptidos GMOP y mGMOP difieren en el número de sitios potenciales de O-glicosilación, esta diferencia no genera cambios apreciables en la farmacocinética cuando se fusiona una sola copia a hIFN: ambos mejoran la farmacocinética respecto al IFN-wt, pero sin diferencias significativas entre ellos. Sin embargo, al incorporar múltiples copias de los péptidos se crea un contexto de hiper-O-glicosilación en el que estas diferencias se vuelven relevantes. En este escenario, la fusión de varias copias de mGMOP produce un mayor incremento de la masa de la proteína y del número de residuos de ácido siálico que la fusión de múltiples copias de GMOP. La diferencia marcada en el tamaño/masa y la carga entre ambas

variantes, acentuada por un alto grado de O-glicosilación, permite discernir las distintas propiedades fisiológicas *in vivo*. Estas propiedades se manifiestan como una clara mejora en la farmacocinética, lo que a su vez confirma la superioridad de mGMOP como una etiqueta peptídica más efectiva bajo condiciones de hiper-O-glicosilación.

2.3.5. Actividad antitumoral *in vivo*

El hIFN- α 2b es capaz de ejercer su acción antitumoral no sólo mediante la inhibición de la proliferación celular, sino también a través de la regulación negativa de la expresión de oncogenes y la inducción de genes supresores de tumores (Belardelli y col., 2002). Asimismo, ha sido descrito como un potente inhibidor de la angiogénesis, un proceso fundamental para el desarrollo y la progresión de tumores sólidos (Enomoto y col., 2017; Indraccolo, 2010). Estas propiedades posicionaron al hIFN como una citoquina clave dentro de las estrategias terapéuticas antitumorales.

Considerando la diversidad de mecanismos mediante los cuales el IFN tipo I ejerce su efecto, la evaluación de su eficacia antitumoral ha sido un área central de investigación preclínica. En particular, numerosos estudios han comparado el IFN-wt con variantes modificadas, como las formas pegiladas o fusionadas, en distintos modelos murinos de cáncer, incluyendo hepatocarcinoma (Hep3B), melanoma y carcinoma renal. Estos trabajos han reportado diferencias significativas en la reducción del volumen tumoral, la supervivencia, la biodistribución y la toxicidad sistémica, evidenciando una ventaja terapéutica de las variantes modificadas frente al hIFN convencional (Enomoto y col., 2017; Vyas y col., 2003; Xue y col., 2021).

En este contexto, las diferencias en el grado de glicosilación, en el contenido de ácido siálico y en los parámetros farmacocinéticos entre las muteínas de fusión y con respecto al IFN-wt motivaron su análisis comparativo en ensayos antitumorales *in vivo*. Aunque no se detectaron diferencias en la actividad antiproliferativa *in vitro* entre las dos moléculas de fusión, se evaluó su eficacia en un entorno fisiológico, donde el microambiente tumoral puede potenciar o limitar la acción de la molécula. En particular, modificaciones estructurales como la hiper-O-glicosilación pueden no afectar la actividad directa sobre células *in vitro*, pero sí mejorar la permanencia y acumulación en los tejidos tumorales, generando efectos antitumorales diferenciales. De esta manera, el ensayo *in vivo* permite determinar no solo la mejora respecto al IFN-wt, sino también las diferencias de eficacia entre ambas moléculas de fusión. Este tipo de ensayos permite evaluar la capacidad de las proteínas para inhibir el crecimiento de tumores sólidos implantados subcutáneamente en modelos animales inmunocomprometidos, lo que representa un entorno fisiopatológico más cercano al contexto clínico real. Para ello, se llevó a cabo un experimento (sección 9.4 de MyM) utilizando ratones *nude* atímicos de la cepa N:NIH nu/nu, en los que se implantaron células tumorales de origen humano de la línea prostática

PC-3. La evolución del crecimiento tumoral se evaluó mediante mediciones seriadas de sus dimensiones a distintos tiempos luego del inicio del tratamiento y cálculo del volumen tumoral (Fig. 62).

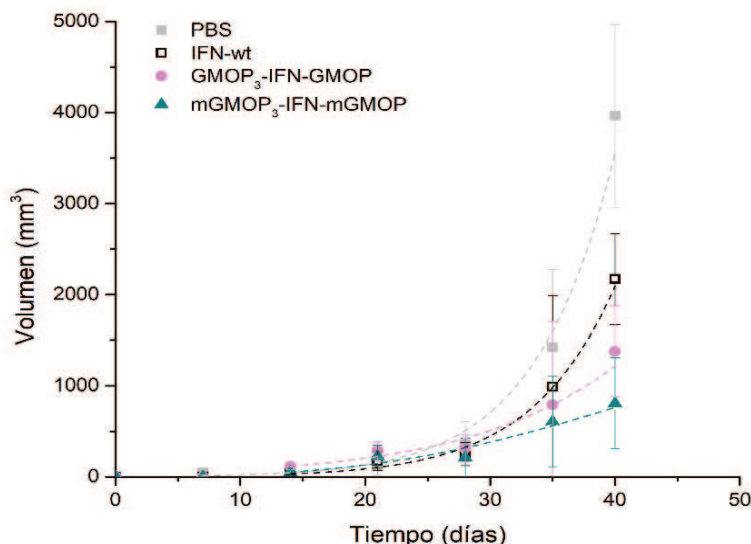


Figura 62: Evaluación del efecto de las variantes hiper-O-glicosiladas del rhIFN sobre el crecimiento tumoral en ratones *nude*. La generación del modelo tumoral se realizó mediante inyección subcutánea de 2×10^6 células de la línea tumoral prostática PC-3. Dos días después de la implantación se comenzó el tratamiento, que consistió en inyecciones semanales de $5 \mu\text{g}$ de IFN-wt (\square), GMOP₃-IFN-GMOP (\bullet) y mGMOP₃-IFN-mGMOP (\blacktriangle). El grupo control (\blacksquare) recibió inyecciones de PBS, empleado como vehículo de las muestras ensayadas. En el gráfico se muestra el volumen tumoral promedio (eje de ordenadas) en función del tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento (eje de abscisas). Los resultados se expresan como el promedio \pm SD (n=5).

El análisis estadístico mediante ANOVA-Welch reveló diferencias significativas ($p < 0,05$) en el volumen tumoral entre los distintos grupos. La prueba *post hoc* de Games-Howell indicó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) tanto entre los grupos tratados con rhIFN (en cualquiera de sus formas) y el grupo control (PBS), como entre el IFN-wt y las variantes fusionadas a los péptidos. Si bien no se observaron diferencias significativas en el volumen tumoral entre los tratamientos con GMOP₃-IFN-GMOP y mGMOP₃-IFN-mGMOP, se detectaron diferencias en sus velocidades de crecimiento.

Para cada tratamiento, fue posible identificar dos fases de crecimiento: una fase inicial lenta, que se extendió desde el inicio del tratamiento hasta el día 28, y una fase final más rápida, comprendida entre los días 28 y 40. A partir del ajuste exponencial de los datos, se estimaron las velocidades de crecimiento de ambas fases y los tiempos de duplicación tumoral para cada condición de la fase final (Tabla 18).

Tabla 18: Parámetros de crecimiento tumoral estimados por ajuste exponencial. Se presentan las velocidades de crecimiento durante las fases inicial (días 0–28) y final (días 28-40), la tasa de crecimiento proporcional (expresada como $\%.\text{día}^{-1}$) y el tiempo de duplicación correspondiente a cada condición. Los valores se expresan como promedio \pm SD (n=5)

Condición	Velocidad fase inicial ($\text{mm}^3.\text{día}^{-1}$)	Velocidad fase final ($\text{mm}^3.\text{día}^{-1}$)	Tasa de crecimiento fase final ($\%.\text{día}^{-1}$)	Tiempo de duplicación fase final (días)
PBS	13 \pm 1	306 \pm 41	20 \pm 1	2,7 \pm 0,2
IFN-wt	7 \pm 3	164 \pm 50	19 \pm 2	3,6 \pm 0,4
GMOP₃-IFN-GMOP	9 \pm 2	93 \pm 33	12 \pm 4	5 \pm 2
mGMOP₃-IFN-mGMOP	9 \pm 5	45 \pm 20	7 \pm 4	13 \pm 7

Durante la fase inicial, las velocidades de crecimiento fueron similares, no detectándose diferencias relevantes entre las distintas condiciones. Sin embargo, en la fase final se observó una marcada ralentización del crecimiento tumoral en los grupos tratados con las variantes hiperglicosiladas, en comparación con el grupo control y con el IFN-wt. En particular, se logró una reducción del 70-85% en la velocidad de crecimiento final respecto al grupo PBS, lo que refleja un efecto antitumoral sostenido en etapas avanzadas del desarrollo tumoral. Resultados similares fueron reportados por Gugliotta y col. (2017), quienes observaron una disminución del 85% en la velocidad de crecimiento de tumores tratados con una variante de rhIFN modificada para incorporar cuatro sitios potenciales de N-glicosilación, a partir del día 26 postinoculación con células PC-3. Asimismo, se observó un incremento notable en el tiempo de duplicación tumoral en las variantes hiperglicosiladas, en comparación con el IFN-wt y con PBS, lo que refuerza el efecto antiproliferativo prolongado de estas muteínas. Es importante resaltar, además, las diferencias observadas entre las variantes fusionadas con los distintos péptidos. Si bien no se detectaron diferencias significativas en la actividad antiproliferativa *in vitro*, el análisis *in vivo* evidenció una disminución más marcada de la velocidad de crecimiento tumoral en ambas fases del estudio para la variante fusionada al péptido mGMOP, en comparación con aquella que contiene GMOP. Si bien esta tendencia deberá confirmarse mediante estudios adicionales, estos resultados preliminares sugieren una posible mejora diferencial del desempeño *in vivo* entre las variantes fusionadas.

Cabe señalar que los valores presentados en la Tabla 18 derivan del ajuste exponencial de las curvas promedio de crecimiento tumoral para cada grupo, por lo que no fue posible realizar un análisis estadístico formal. Por tanto, si bien los resultados muestran tendencias claras en cuanto a la desaceleración del crecimiento tumoral y el aumento del tiempo de duplicación en los grupos tratados con las variantes hiperglicosiladas, serán necesarios estudios adicionales con mayor número de réplicas para confirmar la robustez y significancia estadística de estas observaciones.

Luego de 33 días de tratamiento, se realizó el sacrificio de los ratones, la extracción de los tumores y la determinación de su peso. El análisis estadístico ANOVA-Welch ($p < 0,05$) y la prueba *post hoc* Games-Howell evidenciaron que los tumores tratados con las muteínas presentaron un peso significativamente menor con respecto al control ($p = 0,007$ para GMOP₃-IFN-GMOP y $p = 0,002$ para mGMOP₃-IFN-mGMOP) y al IFN-wt ($p = 0,037$ y $p = 0,029$, respectivamente). No se encontraron diferencias significativas entre el IFN-wt y PBS (Fig. 63).

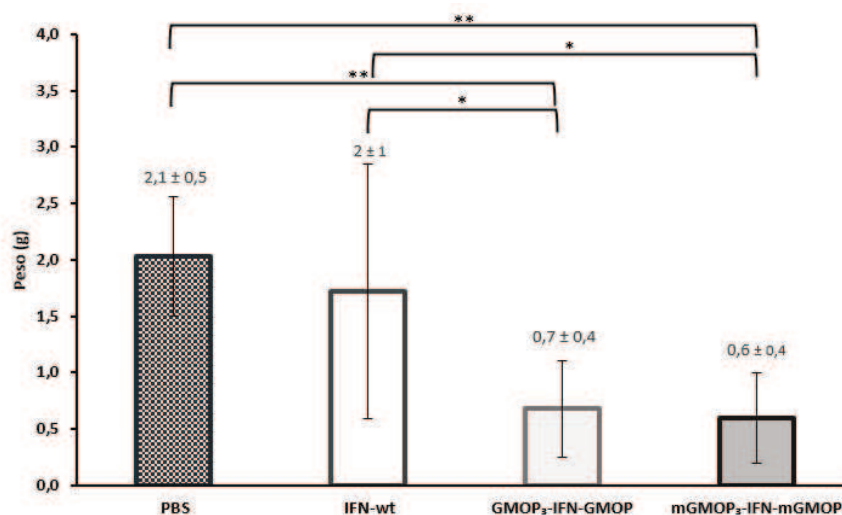


Figura 63: Evaluación del efecto de las variantes hiper-O-glicosiladas del rhIFN sobre el crecimiento tumoral en ratones *nude*. A los 33 días desde el inicio del tratamiento, los animales fueron sacrificados y se procedió a la extracción y determinación del peso de los tumores. En el gráfico se muestra el peso promedio de los tumores correspondiente a cada grupo experimental: PBS, IFN-wt, GMOP₃-IFN-GMOP y mGMOP₃-IFN-mGMOP. Los resultados se expresan como el valor promedio ± SD (n=5). Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas: * ($p < 0,05$) y ** ($p < 0,01$).

Los tumores tratados con las muteínas hiperglicosiladas presentaron menor tamaño y peso y, macroscópicamente, exhibieron una coloración rojiza más tenue, lo que sugiere un menor grado de vascularización en comparación con los del grupo control (PBS) y con los tratados con IFN-wt (Fig. 64).

Con el fin de evaluar diferencias en la vascularización tumoral entre tratamientos, se analizó la intensidad de color en las imágenes de los tumores dispuestos en grillas. La intensidad del canal rojo se empleó como marcador indirecto de vascularización, bajo el supuesto de que una mayor tonalidad rojiza (es decir, menor intensidad de píxeles en dicho canal) refleja una mayor densidad o permeabilidad vascular tumoral. El procesamiento de imágenes se realizó mediante un *script* desarrollado en Google Colab⁷, que permitió automatizar la segmentación de regiones de interés (ROIs) correspondientes a cada tumor y calcular la intensidad promedio del canal rojo para cada uno de ellos. Los valores obtenidos fueron: 181 ± 15 para PBS, 185 ± 14 para el IFN-wt, 190 ± 16 para GMOP₃-IFN-GMOP y 207 ± 15 para mGMOP₃-IFN-mGMOP.

⁷ <https://colab.research.google.com>

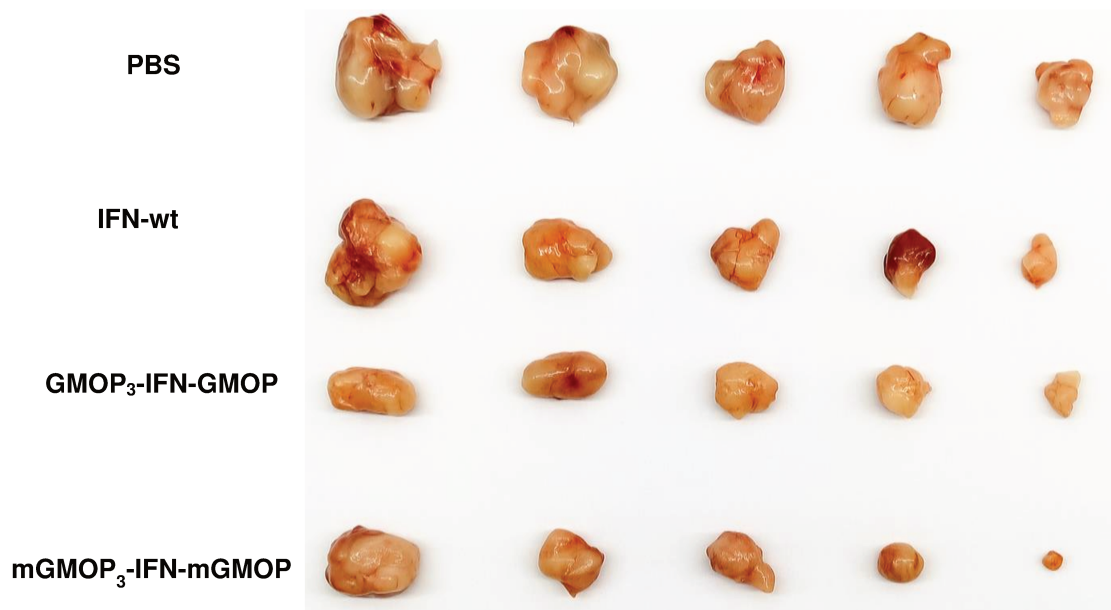


Figura 64: Fotografía de los tumores extraídos de ratones *nude* inoculados con células PC-3 e inyectados con IFN-wt, GMOP₃-IFN-GMOP, mGMOP₃-IFN-GMOP o con la solución vehículo de las moléculas (PBS). Luego de la extracción, los tumores fueron fotografiados y posteriormente pesados.

Estos resultados sugieren que el grupo tratado con mGMOP₃-IFN-mGMOP presenta tumores con menor coloración rojiza, lo que podría interpretarse como una menor vascularización en comparación con los demás tratamientos. El análisis estadístico mediante ANOVA de una vía reveló diferencias significativas entre al menos dos grupos ($p=0,006$). La prueba *post hoc* de Tukey indicó diferencias significativas en la intensidad del canal rojo (y, por lo tanto, la vascularización) entre los tumores tratados con PBS y con mGMOP₃-IFN-mGMOP ($p=0,008$), así como entre IFN-wt y mGMOP₃-IFN-mGMOP ($p = 0,022$). No se observaron diferencias significativas entre los demás pares comparados.

Finalmente, se calculó el tamaño del efecto (Cohen's d) para cada par comparado, a fin de cuantificar la magnitud de las diferencias observadas. Los valores obtenidos fueron: PBS vs mGMOP₃-IFN-mGMOP, $d = 1.73$; IFN-wt vs mGMOP₃-IFN-mGMOP, $d = 1.51$; y GMOP₃-IFN-GMOP vs mGMOP₃-IFN-mGMOP, $d = 1.05$. De acuerdo con los criterios convencionales (Lakens, 2013), estos valores representan efectos grandes a muy grandes, lo que refuerza la relevancia biológica de las diferencias observadas, incluso en los casos donde no se alcanzó significancia estadística (por ejemplo, GMOP₃-IFN-GMOP vs mGMOP₃-IFN-mGMOP). En términos prácticos, un $d > 1$ implica que las distribuciones de los grupos se superponen mínimamente, sugiriendo que la mayoría de los tumores tratados con mGMOP₃-IFN-mGMOP presentan intensidades claramente distintas de las observadas en los tratados con IFN-wt o en los controles con PBS.

En conjunto, estos resultados sugieren que el tratamiento con la variante mGMOP₃-IFN-mGMOP podría inducir una reducción de la vascularización tumoral mayor que

la observada con los demás tratamientos evaluados. Esta hipótesis debe ser confirmada mediante estudios complementarios, tales como la inmunomarcación de vasos sanguíneos (por ejemplo, con CD31) o análisis histológicos, que permitan validar estos hallazgos a nivel morfológico y funcional (Lin y col., 2023; Lopez-Vince y col., 2024).

Los estudios *in vivo* demostraron que ambas muteínas de fusión reducen el tamaño tumoral con mayor eficiencia que el IFN-wt. En particular, mGMOP₃-IFN-mGMOP presentó una menor velocidad de crecimiento durante todo el tratamiento, una menor vascularización y un mayor tiempo de duplicación tumoral. En este contexto, aunque al final del tratamiento no se observaron diferencias significativas en el volumen ni el peso tumoral, la hiper-O-glicosilación conferida al hIFN parecería otorgar una mayor potencia antitumoral *in vivo*, probablemente asociada a una mayor vida media en circulación y una exposición más prolongada de la citoquina en el microambiente tumoral. A pesar de no presentar diferencias significativas en la AAP *in vitro* en relación con la variante GMOP₃-IFN-GMOP, su farmacocinética más favorable podría explicar su superior eficacia *in vivo* y el enlentecimiento del crecimiento tumoral. La velocidad de crecimiento de los tumores tratados con la variante GMOP₃-IFN-GMOP fue mayor que la observada en los tratados con mGMOP₃-IFN-mGMOP, aunque ambas variantes lograron reducir el tamaño y volumen de los tumores de manera comparable. Si bien ambas variantes mostraron efectos terapéuticos relevantes, sería fundamental extender la duración del tratamiento en futuros experimentos *in vivo* para determinar si la mayor persistencia en circulación se traduce efectivamente en una remisión tumoral sostenida. Probablemente, y considerando el período limitado del estudio actual, cualquiera de las muteínas podría conducir a una mejora del tratamiento, por lo que un régimen más prolongado podría aportar mayor precisión sobre el impacto de la farmacocinética en la desaceleración o eventual regresión del crecimiento tumoral. Considerando que no se detectaron diferencias significativas en la AAP evaluada *in vitro* entre ambas variantes hiperglicosiladas, como se discutió anteriormente, es probable que el alto contenido de O-glicanos sea responsable de una disminución de tal magnitud en la capacidad de interactuar con el receptor que enmascare sutiles diferencias entre ellas. Sin embargo, las marcadas diferencias en los parámetros farmacocinéticos de ambas muteínas sugieren que la mayor O-glicosilación conferida por mGMOP podría favorecer una menor depuración plasmática y una mayor persistencia circulante. En este sentido, la modulación de las propiedades farmacocinéticas asociada a la profusa O-glicosilación del péptido mGMOP asumiría un rol preponderante en la disminución más pronunciada de la velocidad de crecimiento tumoral.

Aunque las diferencias en tamaño y volumen tumoral no resultaron significativas en el período analizado, la menor tasa de crecimiento registrada con la variante que porta mGMOP respaldaría la hipótesis de que un mayor número de repeticiones mejora de manera sustancial las propiedades farmacocinéticas de la proteína fusionada en comparación con repeticiones de

GMOP. Futuros estudios, ajustando la dosis, el intervalo de administración y la duración del tratamiento, serán necesarios para establecer con mayor precisión el vínculo entre la hiper-O-glicosilación, la farmacocinética y la actividad biológica *in vivo*.

En síntesis, los resultados obtenidos permiten concluir que la hiper-O-glicosilación incrementa la eficacia antitumoral *in vivo* del hIFN- α 2b al mejorar su perfil farmacocinético y reducir la vascularización tumoral, posicionando a estas variantes como candidatas prometedoras para su evaluación en contextos clínicos.

3. VALIDACIÓN DE BIFUNCIONALIDAD DE LAS ETIQUETAS GMOP Y mGMOP EN rhEPO

La bifuncionalidad de las etiquetas GMOP y mGMOP se evaluó utilizando una nueva proteína modelo: la eritropoyetina humana (hEPO). El objetivo fue concluir acerca del potencial de ambas etiquetas como plataformas versátiles para mejorar las propiedades biológicas de proteínas terapéuticas y, al mismo tiempo, facilitar su detección, purificación y cuantificación. La hEPO representa un modelo adecuado para este propósito, ya que es una glicoproteína extensamente caracterizada y dispone de métodos de purificación y cuantificación bien establecidos, lo que permite la comparación con datos de referencia. No obstante, a pesar de su amplio uso clínico, presenta como principal limitación su corta vida media en circulación, lo que la convierte en un candidato ideal para evaluar estrategias destinadas a prolongar la estabilidad y la bioactividad de proteínas terapéuticas.

Con este fin, se construyeron variantes hiper-O-glicosiladas de hEPO fusionadas a las etiquetas GMOP y mGMOP, incorporando múltiples copias de los péptidos para incrementar la densidad de O-glicosilación y maximizar el efecto sobre la estabilidad y la actividad terapéutica.

3.1. Generación de muteínas de fusión hiper-O-glicosiladas de rhEPO

3.1.1. Diseño de las variantes y análisis *in silico* de los sitios potenciales de O-glicosilación

Mediante el uso de herramientas bioinformáticas se diseñaron dos nuevas variantes de fusión de hEPO, considerando la inclusión de al menos una copia de la etiqueta GMOP o mGMOP en el extremo N de la citoquina. Siguiendo el esquema aplicado a las variantes de rhIFN, se incorporaron tres repeticiones de los péptidos GMOP o mGMOP en el extremo N y una copia en el C. Se añadieron sitios de restricción flanqueando a las etiquetas para permitir, si fuera necesario, la eliminación de copias en futuras etapas. Se utilizaron los mismos sitios que para las muteínas de rhIFN, cuyas secuencias aportan residuos favorables para la O-glicosilación. Finalmente, se reemplazó la señal nativa de hEPO por la del hGM-CSF para asegurar una secreción eficiente. De esta manera, se generaron las siguientes proteínas de fusión (Fig. 65):



Figura 65: Variantes O-glicosiladas de rhEPO conteniendo unidades repetidas de cada péptido. Se muestra el diseño de la molécula para cada variante, cuya nomenclatura se indica a la derecha. Ambas moléculas contienen el péptido señal del hGM-CSF, coloreado en rosado; PG corresponde a Prolina-Glicina (sitio Smal) y GT a Glicina-Treonina (sitio KpnI).

Ambas construcciones fueron flanqueadas por los sitios de restricción BamHI y XhoI, presentes también en el vector de expresión pLV-pLK utilizado en este trabajo.

La probabilidad teórica de O-glicosilación de las variantes se evaluó con los programas NetOGlyc 4.0 e ISOGlyP. Ambos análisis predijeron 19 sitios potenciales de O-glicosilación para GMOP₃-EPO-GMOP y 27 para mGMOP₃-EPO-mGMOP (Tablas 19 y 20).

Tabla 19: Predicción *in silico* de sitios potenciales de O-glicosilación en GMOP₃-EPO-GMOP. Utilización de programas especializados

			NetOGlyc 4.0	ISOGlyP EVP
GMOP₃-EPO-GMOP	Ser	5	0,993891	8,38
	Ser	7	0,974143	4,45
	Ser	9	0,989742	4,20
	Thr	10	0,952701	2,42
	Ser	19	0,990473	8,38
	Ser	21	0,957301	4,45
	Ser	23	0,989437	4,15
	Thr	24	0,892044	2,42
	Ser	35	0,968862	8,38
	Ser	37	0,889692	4,45
	Ser	39	0,947874	4,20
	Thr	40	0,803521	2,42
	Ser	166	0,692008	
	Ser	172	0,86306	7,59
	Thr	214	0,644332	1,88
	Ser	219	0,955168	8,38
	Ser	221	0,886218	4,45
	Ser	223	0,889291	4,15
	Thr	224	0,701246	2,42
Thr	230		1,56	
TOTAL			19	19

Si bien ambos programas predicen un total de 19 sitios potenciales de O-glicosilación para GMOP₃-EPO-GMOP, difieren en un sitio: NetOglyc identifica la Ser166, mientras que ISOGlyP predice una Thr presente en el extremo C (Thr230). Estas discrepancias pueden deberse a los distintos algoritmos y criterios de predicción. En el caso de mGMOP₃-EPO-mGMOP ocurre algo similar: ambos servidores coinciden en el número total de sitios, pero difieren entre la Ser169 y la Thr234.

Tabla 20: Predicción *in silico* de sitios potenciales de O-glicosilación de mGMOP₃-EPO-mGMOP. Utilización de programas especializados

			NetOGlyc 4.0	ISOGlyP EVP
mGMOP₃-EPO-mGMOP	Ser	5	0,993759	8,38
	Ser	7	0,986568	11,26
	Thr	9	0,987545	56,72
	Thr	11	0,992309	52,04
	Thr	13	0,986307	18,14
	Thr	15	0,988561	10,59
	Ser	20	0,997109	8,38
	Ser	22	0,994548	11,26
	Thr	24	0,989249	56,72
	Thr	26	0,986719	52,04
	Thr	28	0,983002	52,04
	Thr	30	0,982517	29,21
	Ser	37	0,994384	8,38
	Ser	39	0,989571	11,26
	Thr	41	0,968916	56,72
	Thr	43	0,987616	52,04
	Thr	45	0,970579	52,04
	Thr	47	0,964157	29,21
	Ser	169	0,628996	
	Ser	175	0,813113	7,59
	Thr	217	0,621989	1,88
	Ser	222	0,984178	8,38
	Ser	224	0,9657	11,26
	Thr	226	0,961245	56,72
	Thr	228	0,938762	52,04
	Thr	230	0,835292	20,52
	Thr	232	0,517834	5,71
Thr	234		1,90	
TOTAL			27	27

Ambos programas detectaron tanto los sitios aportados por las etiquetas como la Ser172, único sitio naturalmente O-glicosilado en la hEPO. La Ser166/ Ser169, identificada por NetOGlyc, no mostró un EVP positivo para ninguna de las GalNAc-Transferasas evaluadas. Cabe destacar que la O-glicosilación depende de la expresión de un subconjunto específico de transferasas homólogas de polipéptido GalNAc (GALNT) expresadas en cada célula. En células CHO, este

repertorio es limitado y se han descrito solo 5 isoformas funcionales (T1, T2, T7, T11 y T19) (Yang y col., 2012).

Al igual que en el caso de hIFN, la variante con el péptido mGMOP exhibe 8 sitios probables de O-glicosilación más que la variante con el péptido GMOP, lo cual concuerda con el hecho de que cada etiqueta de mGMOP presenta 2 sitios potenciales adicionales en comparación con GMOP.

3.1.2. Desarrollo de líneas celulares productoras de las variantes de rhEPO

Para la obtención de las líneas celulares estables productoras de GMOP₃-EPO-GMOP y mGMOP₃-EPO-mGMOP, se siguió el mismo procedimiento utilizado para las líneas productoras de las muteínas de rhIFN. Este proceso incluyó la construcción de los vectores lentivirales de tercera generación, a partir del clonado de las secuencias codificantes de cada una de las variantes, y el posterior ensamblado de los lentivirus para su utilización en la transducción celular.

3.1.2.1. Construcción de vectores de expresión para células eucariotas y ensamblado de partículas lentivirales

Los vectores de expresión pLV-pLK-GMOP₃-EPO-GMOP y pLV-pLK-mGMOP₃-EPO-mGMOP se generaron siguiendo el mismo procedimiento descrito para las variantes de rhIFN. Las secuencias optimizadas en pUC57 fueron digeridas con BamHI/XhoI y clonadas en el vector pLV-pLK. Los clones positivos fueron verificados por digestión y secuenciación, confirmándose la integridad de las construcciones y la ausencia de mutaciones indeseadas. Posteriormente, los vectores se emplearon para el ensamblado de PLs mediante co-transfección de células empaquetadoras HEK 293T/17 con los vectores estructurales (pRSV-REV, pMD.G, pMDL/pRRE). De la misma manera que para rhIFN, el vector pLV-pLK-GFP se empleó como control de transfección y transducción. Los sobrenadantes conteniendo las PLs fueron concentrados y almacenados a -70 °C hasta su uso.

3.1.2.2. Generación de líneas celulares

La generación de las líneas sCHO recombinantes se realizó mediante transducción con las PLs obtenidas en la etapa previa, siguiendo el mismo protocolo aplicado para las variantes de rhIFN. Se realizaron cuatro rondas sucesivas de transducción para maximizar la incorporación del transgén. En paralelo, se utilizó una línea control transducida con el vector pLV-pLK-GFP para verificar la funcionalidad de las PLs y la eficiencia del protocolo. Los cultivos transducidos con GFP fueron analizados por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo, observándose desde la primera transducción un elevado porcentaje de células fluorescentes (entorno al 100%), confirmando la alta eficiencia de transducción (Fig. 66).

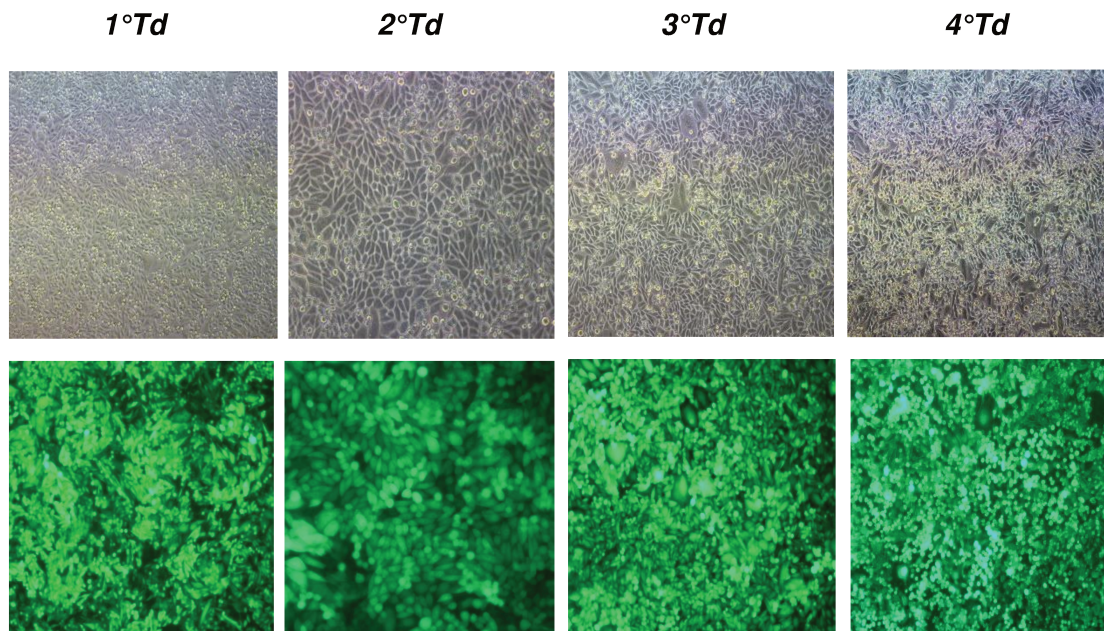


Figura 66: Microscopía de campo claro y de fluorescencia de las transducciones 1 a 4 de células sCHO con el vector lentiviral pLV-pLK-GFP. En el panel superior se observa el número total de células; en el panel inferior se observan las células verdes que incorporaron el transgén que codifica para la proteína GFP. Td: transducción.

Durante las sucesivas rondas de transducción se observó un desplazamiento progresivo de la población celular hacia mayores intensidades de fluorescencia verde en los histogramas de citometría de flujo, indicando un aumento de la expresión del transgén. Al finalizar la cuarta transducción, el 97% de las células mostró una fluorescencia elevada y sólo un 3% presentó niveles menores. Este aumento podría reflejar una mayor cantidad de copias del transgén por célula o a una regulación positiva de su expresión. En paralelo, la población negativa desapareció casi por completo, evidenciando la eliminación de células no transducidas.

Posteriormente, se analizó la productividad de las líneas sCHO-GMOP₃-EPO-GMOP y sCHO mGMOP₃-EPO-mGMOP luego de cada etapa de transducción (Fig. 67). Para ello, se recolectaron sobrenadantes de cultivo de 24 h y se determinó la concentración de las proteínas mediante un ELISA sándwich específico para rhEPO, validado previamente para la cuantificación de otras variantes de la hormona (sección 8.3.2 de MyM). A partir de estos valores y de los recuentos celulares, se calcularon las productividades específicas de cada línea empleando la ecuación 5 de la sección 5.8.7 de MyM.

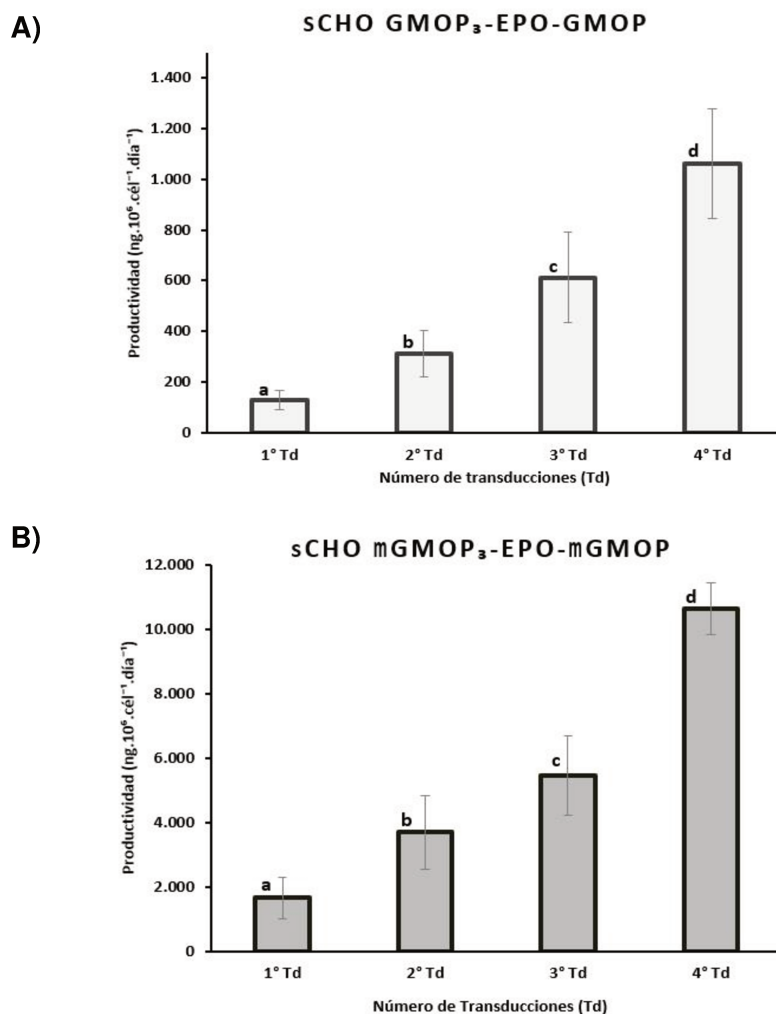


Figura 67: Productividad de las líneas celulares: **A)** sCHO-GMOP₃-EPO-GMOP y **B)** sCHO-mGMOP₃-EPO-mGMOP, luego de cada ronda de transducción. Se muestra el promedio de los resultados obtenidos en cuatro ensayos independientes \pm SD. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$)

Como se muestra en los gráficos, la productividad de ambas líneas aumentó con el número de transducciones, en concordancia con el incremento en la intensidad de fluorescencia. Los valores obtenidos fueron superiores con respecto a los correspondientes a las variantes de rhIFN, lo que podría atribuirse a la integración del vector en regiones genómicas con alta actividad transcripcional y/o la incorporación de un mayor número de copias del transgén. Adicionalmente, esta diferencia podría reflejar una mayor tolerancia celular a la sobreexpresión de rhEPO en comparación con rhIFN, cuya actividad biológica podría afectar el estado fisiológico de las células productoras, incluso en sus variantes hiperglicosiladas.

3.1.2.3. Selección de líneas celulares productoras

Con el fin de enriquecer los cultivos con células de mayor expresión y homogeneizar la población celular, se aplicó presión de selección con puromicina sobre las líneas celulares que recibieron cuatro rondas de transducción. Se plaquearon las células de ambas líneas y se

expusieron durante 48 h a diferentes concentraciones del antibiótico (entre 50 y 100 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ con incrementos de 10 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$). Tras retirar el medio de selección, los cultivos se incubaron 48 h adicionales para su recuperación. Finalmente, se cosecharon los sobrenadantes y se evaluó la productividad de cada línea en cada condición de selección (Fig.68).

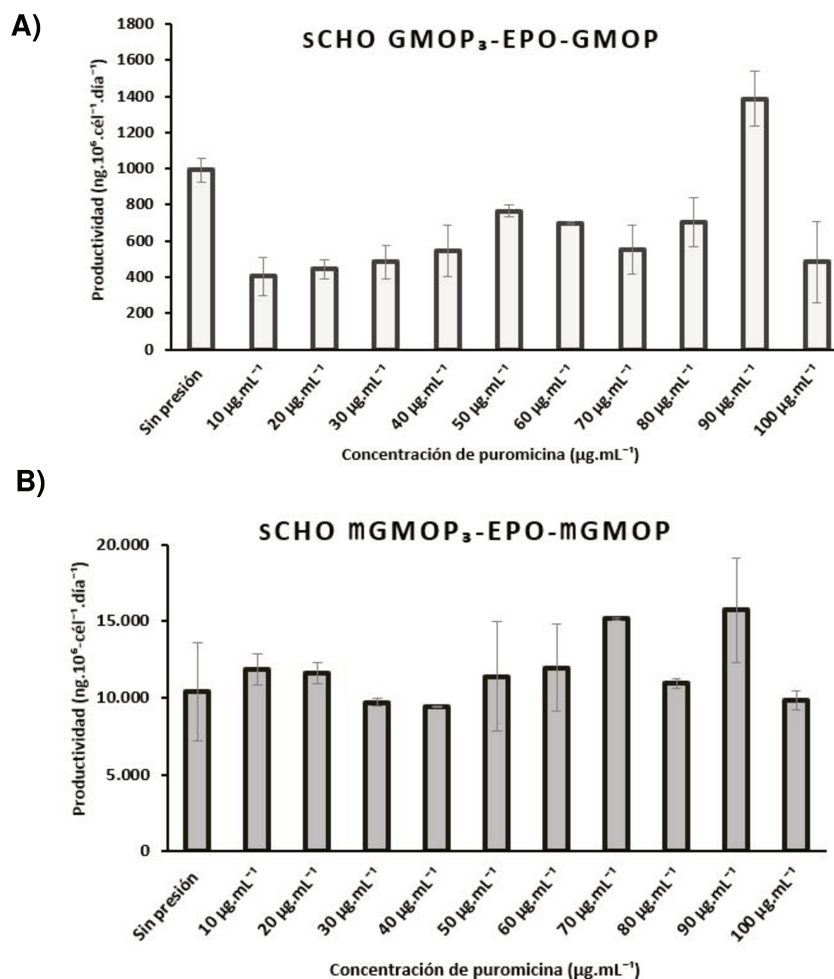


Figura 68: Primera etapa de presión selectiva. Productividad de las líneas transducidas **A)** sCHO GMOP₃-EPO-GMOP y **B)** sCHO mGMOP₃-EPO-mGMOP luego de su exposición a distintas concentraciones de puromicina.

La línea sCHO mGMOP₃-EPO-mGMOP mantuvo su productividad frente a distintas concentraciones de puromicina, alcanzando un máximo de 16 $\mu\text{g}.\text{10}^6.\text{cél}^{-1}.\text{día}^{-1}$ a 90 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, valor considerado adecuado para su selección como línea productora de esta variante. En cambio, la línea sCHO GMOP₃-EPO-GMOP mostró una disminución inicial de la productividad, que solo se recuperó a 90 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de puromicina, alcanzando un valor de 1,3 $\mu\text{g}.\text{10}^6.\text{cél}^{-1}.\text{día}^{-1}$, similar al de la línea sin presionar. Este comportamiento podría deberse a un posible silenciamiento epigenético, que podría revertirse parcialmente mediante la presión selectiva. Por este motivo, se realizó una segunda etapa de presión, incrementando gradualmente la

concentración del antibiótico hasta $280 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, lo que permitió alcanzar una productividad de $3 \mu\text{g}\cdot 10^6\cdot\text{cél}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ y constituyó la línea celular productora de esta variante.

3.1.2.4. Adaptación al crecimiento en suspensión

Las líneas celulares de mayor productividad se adaptaron al crecimiento en suspensión en medio libre de SFB siguiendo el protocolo descrito en la sección 5.8.6 de MyM, mediante una transición en dos etapas: primero al medio EX-CELL® 302 y luego al medio PM. En el caso de la línea sCHO mGMOP₃-EPO-mGMOP, la adaptación inicial se realizó de manera gradual, obteniéndose una productividad de $2,5 \mu\text{g}\cdot 10^6\cdot\text{cél}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$. Dado que dicho valor representó una disminución significativa respecto al obtenido en condiciones de adherencia, se realizó una adaptación directa al medio PM. Una vez comprobado un crecimiento estable, se evaluó nuevamente la productividad, obteniéndose un valor de $1,5 \mu\text{g}\cdot 10^6\cdot\text{cél}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$. A pesar de la disminución observada, la productividad se consideró adecuada para la producción de la proteína de interés, priorizando las ventajas regulatorias y operativas del medio PM. En cuanto a la línea sCHO GMOP₃-EPO-GMOP, con el fin de reducir el tiempo de cultivo y evitar posibles efectos de inestabilidad genética asociados a cultivos prolongados, se realizó una adaptación directa tanto al medio EX-CELL® 302 como al medio PM. La productividad final obtenida fue de $1,9 \mu\text{g}\cdot 10^6\cdot\text{cél}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$, valor que se consideró igualmente suficiente para la producción de la proteína recombinante deseada.

3.1.2.5. Producción de las variantes de interés

La producción a mayor escala de las variantes O-glicosiladas de rhEPO se llevó a cabo en frascos Schott de 1 L de capacidad, de acuerdo con lo descrito en la sección 5.8.8 de MyM. Se realizaron un total de 10 cosechas, obteniéndose concentraciones entre 20 y $90 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para GMOP₃-EPO-GMOP y entre 30 y $80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para mGMOP₃-EPO-mGMOP. La masa total obtenida para ambas muteínas fue de aproximadamente 68 mg.

3.2. Validación del sistema de afinidad GMOP/mGMOP-mAb CC1H7 en las muteínas de fusión de rhEPO

El desempeño del sistema de epítipo-mAb CC1H7 se evaluó en las nuevas variantes de fusión de rhEPO, con el objetivo de verificar la confiabilidad de los métodos y validar su aplicabilidad en el contexto de otra proteína.

3.2.1. Purificación de las variantes de rhEPO mediante CIA empleando el mAb CC1H7

El proceso de purificación de rhEPO y de variantes derivadas de esta molécula ha sido históricamente un área activa de investigación debido a su complejidad y alto costo. Para lograr

una adecuada separación y concentración del producto, suelen emplearse combinaciones de técnicas cromatográficas, como intercambio iónico, exclusión por tamaño, interacción hidrofóbica, fase reversa, y en particular, cromatografía de afinidad, ya sea bioespecífica (CIA) o pseudoespecífica. Dado que la pureza deseada incrementa el número de etapas y reduce el rendimiento final, la cromatografía de afinidad se destaca por su alta especificidad y selectividad, lo que permite reducir la cantidad de pasos necesarios para alcanzar elevados niveles de pureza (Adamíková y col., 2019). Pese a su mayor costo, constituye una estrategia eficiente para obtener material con alto rendimiento y elevada actividad biológica desde las primeras etapas de purificación.

Bajo estos fundamentos, la técnica desarrollada con el sistema mGMOP-mAb CC1H7 ofrecería condiciones adecuadas para su aplicación como etapa inicial de purificación. Además, su validación en una proteína de la complejidad de la rhEPO permitiría demostrar la versatilidad y eficiencia del enfoque.

De esta manera, las variantes de rhEPO fueron purificadas por CIA empleando el mAb CC1H7 acoplado a una resina *Sepharose* activada con CNBr (sección 7.1.1 de MyM), utilizando el protocolo optimizado para las variantes de rhIFN, es decir, en condiciones de elevada fuerza iónica, las cuales se alcanzaron mediante el empleo de Na₂SO₄ 1 M en las etapas de siembra y lavados. Asimismo, la elución se realizó mediante disminución de la concentración de sal en forma simultánea al incremento de pH (pH 11) (sección 7.1.4 de MyM). En la Fig. 69 se muestran los cromatogramas obtenidos para ambas variantes. Los porcentajes de recuperación para cada etapa del proceso se detallan en la Tabla 21.

El protocolo permitió la recuperación eficiente de ambas proteínas, mostrando perfiles cromatográficos comparables a los obtenidos previamente para las muteínas de IFN. Los cromatogramas exhibieron un único pico de elución coincidente con el incremento de pH y la disminución de la conductividad, lo que indica una elución específica de la proteína de interés. Esta estrategia de purificación resultó claramente superior a otros métodos empleados previamente en el laboratorio, los cuales presentaron limitaciones significativas en términos de rendimiento y pureza. En particular, un método de pseudoafinidad basado en la unión al colorante *Cibacron Blue* mostró bajas recuperaciones (5-30%) y purezas reducidas (17-20%), especialmente en variantes de rhEPO portando sitios adicionales de N-glicosilación (Dorella y col., 2017). Posteriormente, una estrategia de afinidad bioespecífica utilizando el mAb 2B2 permitió mejorar parcialmente los resultados, alcanzando recuperaciones del 50–60% y purezas inferiores al 90% (Bürgi y col., 2021).

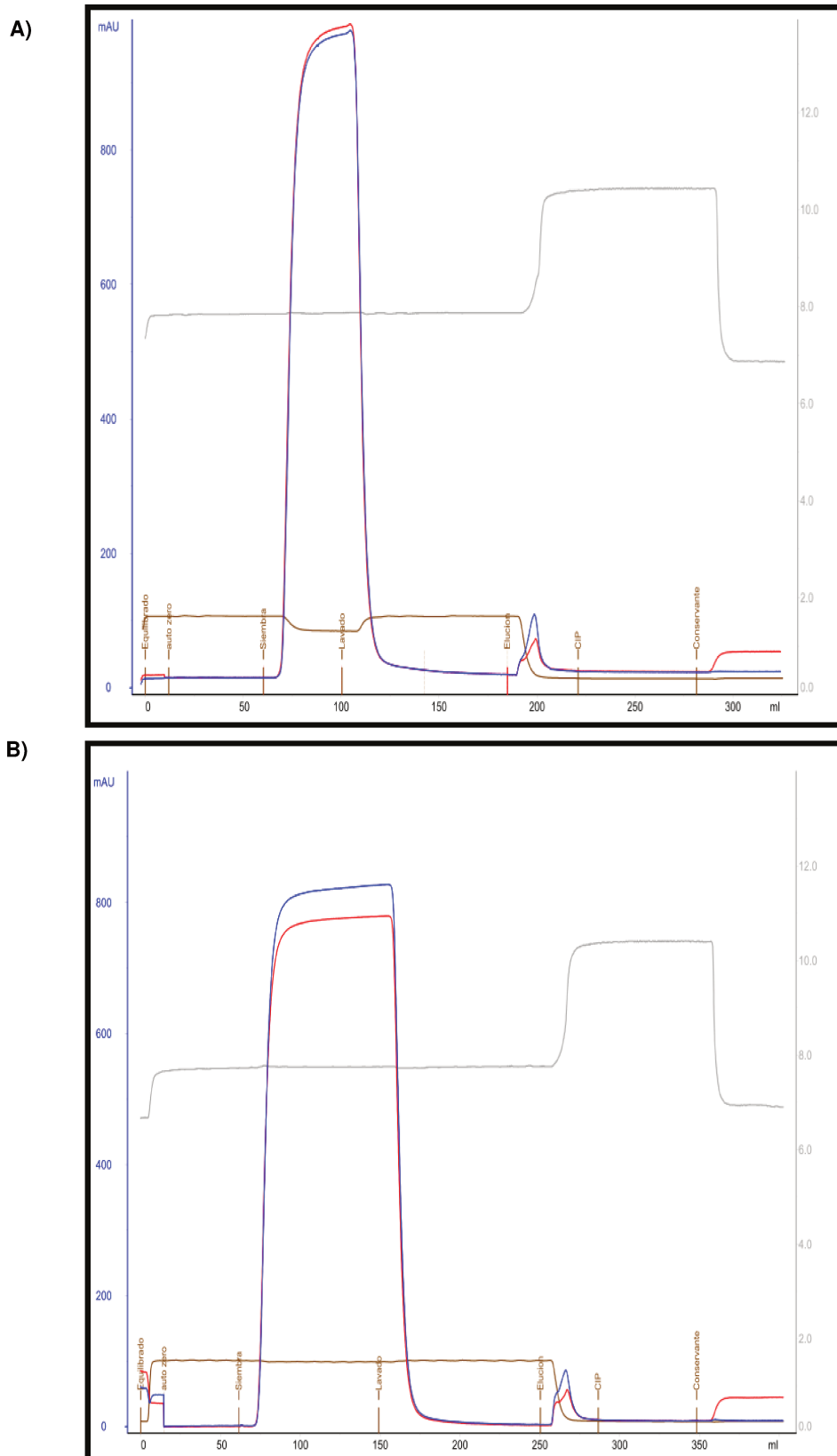


Figura 69: Purificación de GMOP₃-EPO-GMOP (A) y de mGMOP₃-IFN₃-mGMOP (B) por CIA empleando el mAb CC1H7. En el cromatograma se representan las señales de absorbancia a $\lambda=280$ nm (azul), conductividad (marrón) y pH (gris) en función del volumen de elución. Se indica, además, el inicio de las etapas de equilibrado, siembra, lavados, elución, CIP y agregado de solución de conservación de la matriz.

Tabla 21: Porcentaje de recuperación (%R) en cada fracción de la purificación de las variantes de rhEPO mediante CIA- mAb CC1H7

	GMOP ₃ -EPO-GMOP		mGMOP ₃ -EPO-mGMOP	
	Masa (µg)	%R	Masa (µg)	%R
Siembra	406		735	
FT	20	5	66	9
Lavado 1	15	4	32	5
Elución	358	88	631	86
Conservante	13	3	5	1
%R Global		100		100

En contraste, el protocolo basado en el mAb CC1H7 mostró una eficiencia superior, evidenciada por un único pico de elución correspondiente a la variante purificada, con una recuperación total (100%), sin retención de proteína en la matriz. La pureza final alcanzó valores entre 96-99%, lo que representa un aumento de tres veces respecto al material de partida y una mejora sustancial con respecto a los protocolos de referencia descritos más arriba (Fig. 70).

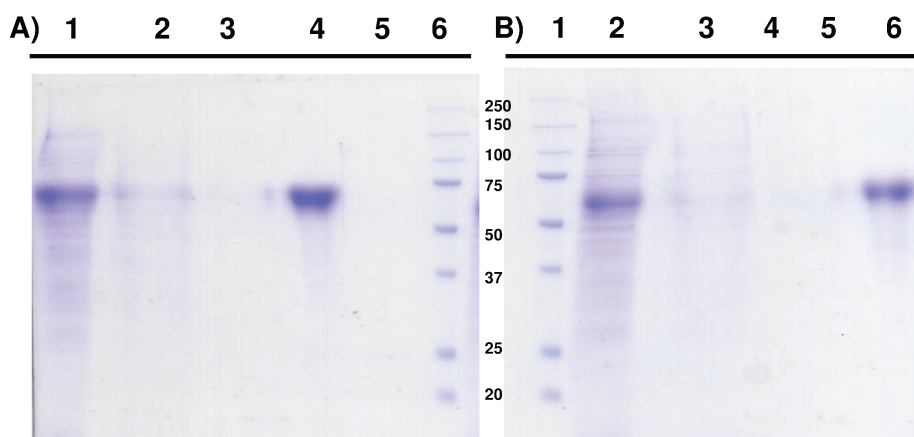


Figura 70: Purificación de las variantes hiper-O-glicosiladas de rhEPO por CIA empleando el mAb CC1H7. Análisis por SDS PAGE en condiciones reductoras y tinción con azul brillante de Coomassie. A) mGMOP₃-EPO-mGMOP. Calles: 1- Siembra; 2- FT; 3- Lavado; 4- Elución; 5- Conservante; 6- MMM. B) GMOP₃-EPO-GMOP. Calles 1- MMM; 2- Siembra; 3- FT; 4 y 5- Lavado; 6- Elución.

Las fracciones purificadas se concentraron y diafiltraron contra PBS para su posterior caracterización.

3.2.2. Empleo del sistema mGMOP-mAb CC1H7 para la cuantificación y detección de las variantes de fusión de rhEPO

3.2.2.1. ELISA de competición

Para evaluar la aplicabilidad de la herramienta de cuantificación desarrollada mediante el sistema mGMOP-mAb CC1H7, se analizó su desempeño con la nueva variante mGMOP₃-EPO-mGMOP. Dada la cantidad de copias del péptido presentes en esta molécula, se empleó el protocolo definido en la sección 1.3.1 de RyD, utilizando las condiciones previamente optimizadas para la variante mGMOP₃-IFN-mGMOP. En este ensayo, la variante mGMOP₃-IFN-mGMOP se utilizó como antígeno inmovilizado en la placa y como estándar de cuantificación, realizando la competición con la molécula a cuantificar (mGMOP₃-EPO-mGMOP). Se realizó la transformación logarítmica de las concentraciones para obtener una distribución normal y las curvas de dosis-respuesta se ajustaron mediante ajuste logístico (Fig. 71) para obtener las cifras de mérito que se presentan en la Tabla 22.

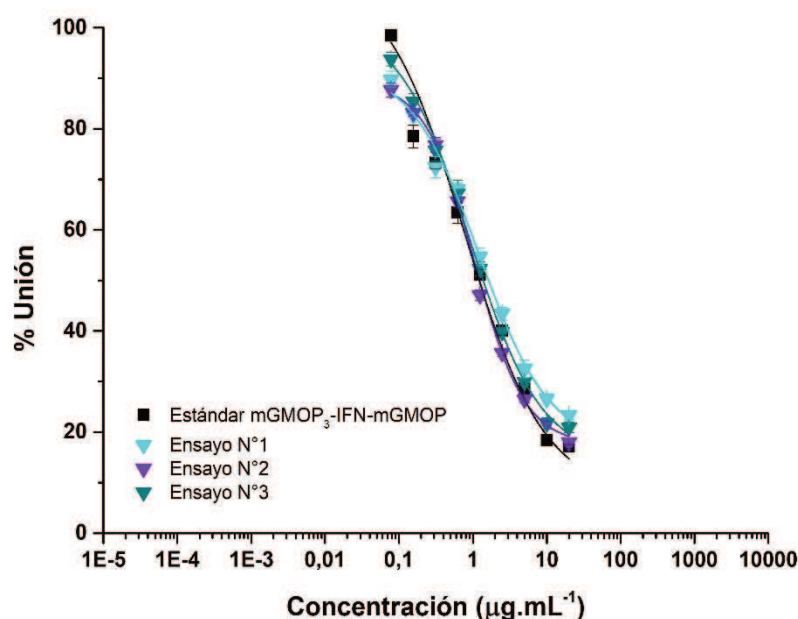


Figura 71: ELISA de competición para la variante mGMOP₃-EPO-mGMOP. Se presentan las curvas de ensayos independientes (n=3) con valores promedio ± desviación estándar para dicha variante y la respuesta de la molécula mGMOP₃-IFN-mGMOP a modo comparativo y como potencial estándar de cuantificación.

Tabla 22: Cifras de mérito para el ELISA de competición para la variante mGMOP₃-EPO-mGMOP.

Se presentan los valores promedio ± DS

	Diluyente
LOD (µg.mL ⁻¹)	0,20 ± 0,04
LOQ (µg.mL ⁻¹)	0,3 ± 0,1
SEN (% Unión. mL.µg ⁻¹)	41 ± 9
SENγ (µg.mL ⁻¹)	30 ± 5

Las cifras de mérito obtenidas para los ensayos evaluados para las dos variantes con múltiples copias de mGMOP (mGMOP₃-IFN-mGMOP y mGMOP₃-EPO-mGMOP) mostraron valores muy similares de LOD, LOQ y sensibilidad, sin evidenciar diferencias que indiquen un impacto significativo del competidor utilizado. En conjunto, estos resultados indican que el formato competitivo es adecuado para ambas proteínas, manteniendo un desempeño analítico comparable.

La exactitud se evaluó mediante la prueba EJCR (Fig. 72). Las elipses de todas las réplicas incluyeron el punto ideal (1,0), lo que confirma la exactitud del ensayo para esta variante de fusión.

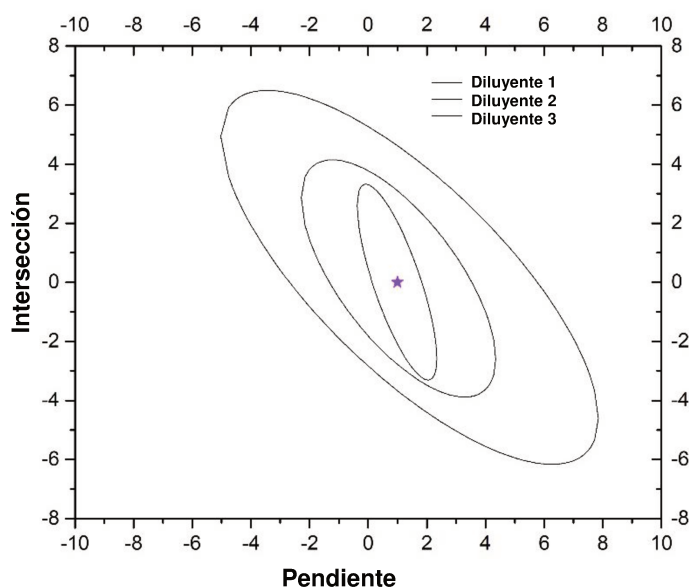


Figura 72: Test EJCR para mGMOP₃-EPO-mGMOP. El análisis se realizó por triplicado en solución diluyente. El punto central (1,0) se ubica dentro de cada elipse, confirmando la exactitud del ensayo.

La prueba de paralelismo no evidenció diferencias significativas ($p = 0,7085$) entre las pendientes de las curvas dosis–respuesta de mGMOP₃-EPO-mGMOP y mGMOP₃-IFN-mGMOP. Esto demuestra la versatilidad del sistema, sugiriendo que puede utilizarse para cuantificar cualquier proteína que porte la etiqueta mGMOP utilizando un único estándar.

Finalmente, la precisión se evaluó en tres niveles de concentración del analito mGMOP₃-EPO-mGMOP. La muestra se procesó por triplicado dentro de cada ensayo, reiterándose en tres experimentos independientes (Tabla 23).

Tabla 23: Evaluación de la precisión del ELISA de competición para la cuantificación de mGMOP₃-EPO-mGMOP en solución diluyente

		CV% intraensayo	CV% intraensayo
Concentración	5	3	7
evaluada (µg.mL ⁻¹)	2,5	5	7
	0,625	5	14

Estos resultados confirman la alta precisión del ensayo, respaldando su idoneidad en aplicaciones cuantitativas para moléculas etiquetadas con el péptido mGMOP.

3.2.2.2. Western blot

La utilidad del sistema GMOP/mGMOP-mAb CC1H7 como método de detección se evaluó para las variantes de fusión de rhEPO mediante un ensayo de *western blot*, empleando el protocolo previamente validado para las variantes de rhIFN.

En una primera etapa se determinaron las cifras de mérito para la variante mGMOP₃-EPO-mGMOP, determinándose los valores de LOD y LOQ (Fig. 73).

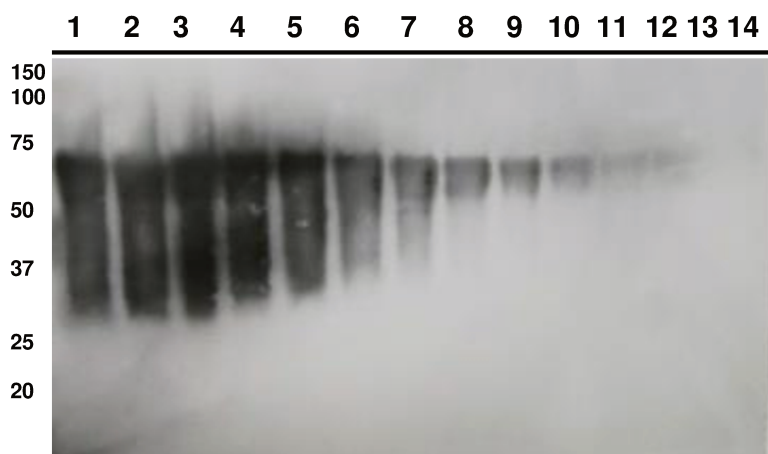


Figura 73: Determinación del LOD utilizando el mAb CC1H7 como herramienta de detección de mGMOP₃-EPO-mGMOP. Calles 1 a 12- Diluciones de la molécula de mGMOP₃-EPO-mGMOP. Calles 13 y 14- Blancos de reactivos.

Como puede observarse, el número de isoformas detectables disminuyó al reducir la cantidad de muestra sembrada en cada carril, conservándose la detección de aquellas presentes en mayor proporción. El LOD se estimó en 4 ng y el LOQ en 10 ng, valores comparables a los obtenidos para mGMOP-IFN, aunque ligeramente inferiores a los del análogo con 4 etiquetas. Sin embargo, estas diferencias no resultaron significativas ni indicativas de una mayor detectabilidad por parte del mAb CC1H7. Cabe señalar que la exposición del epítopo puede variar entre moléculas, pero este ensayo no permite evaluar dicha influencia debido a factores experimentales como la eficiencia de transferencia o el grado de desnaturalización proteica.

El ensayo de *western blot* se empleó para comparar el perfil electroforético de las variantes hiperglicosiladas fusionadas a ambos péptidos. La detección se realizó en forma paralela con dos anticuerpos: el mAb CC1H7 y un pAb anti-rhEPO desarrollado en el laboratorio, capaz de reconocer múltiples epitopes de rhEPO. Como controles, se incluyeron rhGM-CSF y rhEPO. Como se mencionó, la rhEPO es una proteína altamente glicosilada, cuya N-glicosilación representa aproximadamente la mitad de su MM (34-39 kDa) (O'Flaherty y col., 2024). Esta extensa glicosilación puede dificultar la detección por interferencia estérica de los N-glicanos voluminosos y ramificados. En la Fig. 74A se observa que el pAb anti-EPO fue capaz de reconocer tanto la rhEPO como las dos variantes de fusión, pero no detectó rhGM-CSF, como era esperable dada su especificidad. Por su parte, el mAb CC1H7 reconoció exitosamente ambas moléculas de fusión y también al rhGM-CSF, que contiene al epítipo en su estructura nativa, sin mostrar reactividad frente a la rhEPO (Figura 74B), lo que confirma su alta especificidad. Cabe destacar que, aun en presencia de glicosilaciones extensas, ni los N-glicanos de la rhEPO ni los O-glicanos del péptido de fusión afectaron el reconocimiento por parte del mAb CC1H7.

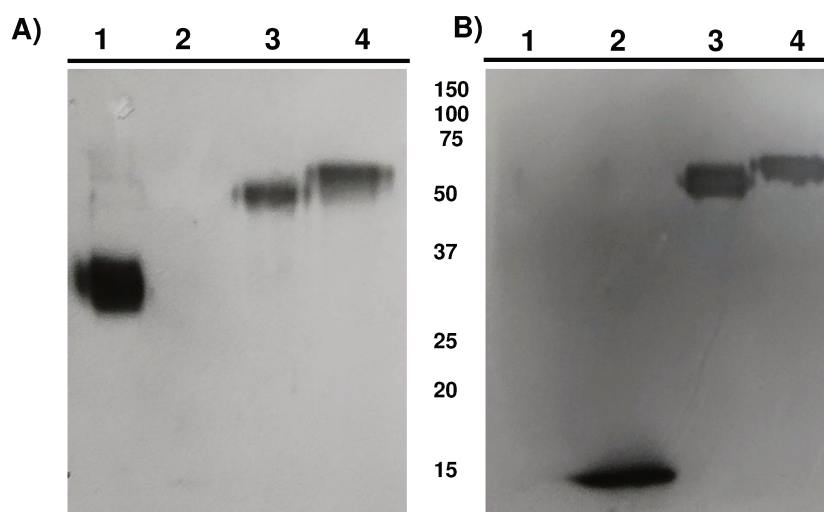


Figura 74: Perfil de masas moleculares de las muteínas de rhEPO evaluado mediante SDS-PAGE seguido de *western blot*. Inmunodetección con: A) pAb anti-rhEPO y B) mAb CC1H7. Calles: 1- rhEPO; 2- rhGM-CSF; 3- GMOP₃-EPO-GMOP; 4- mGMOP₃-EPO-mGMOP.

El mAb CC1H7 detectó un patrón de bandas de distinta movilidad electroforética, similar al observado con el pAb anti-EPO. Aunque era esperable que el pAb reconociera múltiples glicofomas, resulta especialmente relevante que el mAb CC1H7 también detectara todas las isoformas, ya que refuerza la idea de que la glicosilación no impide el acceso al epítipo contenido en las etiquetas GMOP y mGMOP. Es importante mencionar que la conformación extendida o desnaturalizada de las proteínas luego del tratamiento con SDS y el agente reductor de puentes disulfuro permitiría la mayor accesibilidad del mAb CC1H7 que, como fue

informado, reconoce fundamentalmente la estructura peptídica APARSPS (Oggero y col., 2004).

El perfil electroforético de las variantes mostró una MM de aproximadamente 50-75 kDa, superior a la de la rhEPO, atribuible tanto a las secuencias peptídicas añadidas como a los O-glicanos expresados por ellas. La variante mGMOP₃-EPO-mGMOP presentó una masa ligeramente mayor con respecto a GMOP₃-EPO-GMOP, lo que sugiere un mayor número de glicofomas.

En conjunto, estos hallazgos confirman la robustez y especificidad del sistema de detección basado en la interacción entre el epítopo peptídico y el mAb CC1H7, destacando su potencial para etiquetar diversas variantes terapéuticas glicosiladas.

3.3. Validación de la funcionalidad biológica de las etiquetas GMOP y mGMOP en rhEPO

Para evaluar el potencial de los péptidos como herramientas para mejorar las propiedades funcionales de proteínas terapéuticas, se analizaron las nuevas moléculas en términos de sus isoformas glicosídicas, estructura tridimensional y actividad biológica. Esta caracterización permite determinar si la fusión con las etiquetas peptídicas modifica las propiedades de la hEPO y, por extensión, si los péptidos podrían aplicarse a otras proteínas. En este sentido, se llevaron a cabo ensayos comparativos orientados a determinar su comportamiento bioquímico y biológico para el diseño de bioterapéuticos.

3.3.1. Caracterización analítica

3.3.1.1. Deglicosilación de las variantes de rhEPO

La presencia de O-glicanos en las proteínas de fusión se confirmó mediante el tratamiento secuencial con enzimas glicosidasas. Dado el alto contenido de N-glicanos característico de la rhEPO, el análisis del perfil glicosídico requirió, en primer lugar, un proceso de N-deglicosilación y, posteriormente, la O-deglicosilación. Este enfoque permitió distinguir el aporte específico de los O-glicanos, ya que estos representan el mayor contenido de este tipo de modificación en dichas proteínas.

Tanto las variantes GMOP₃-EPO-GMOP y mGMOP₃-EPO-mGMOP como la rhEPO utilizada como control fueron tratadas con PNGasa F en condiciones desnaturalizantes, lo que permite reducir la cantidad de enzima requerida para la remoción completa de los N-glicanos. Posteriormente, las proteínas N-deglicosiladas fueron sometidas a un tratamiento enzimático para la eliminación de los O-glicanos, siguiendo el protocolo previamente aplicado a las variantes de rhIFN.

El análisis por SDS-PAGE (Fig. 75) posterior a las digestiones enzimáticas mostró un desplazamiento progresivo en la movilidad electroforética, desde las formas altamente

N-,O-glicosiladas hacia las O-glicosiladas y, finalmente, hacia las proteínas no glicosiladas, evidenciando la presencia de distintos tipos de glicanos en las proteínas analizadas.

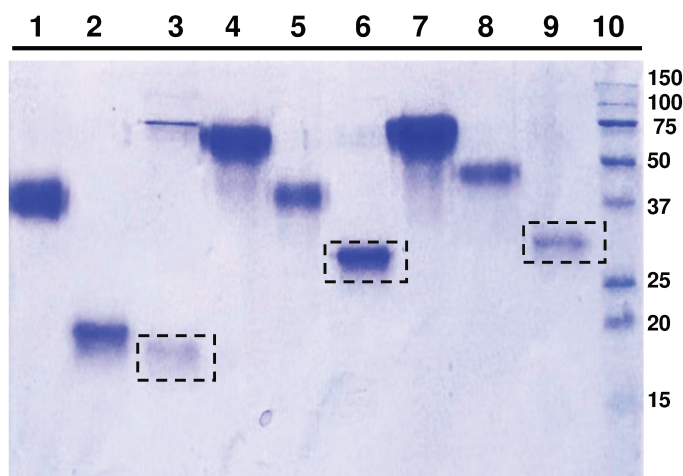


Figura 75: Análisis de la deglicosilación enzimática de rhEPO y de las variantes GMOP₃-EPO-GMOP y mGMOP₃-EPO-mGMOP mediante SDS-PAGE. Calles: 1- rhEPO sin digerir; 2-rhEPO N-deglicosilada; 3-rhEPO N,O-deglicosilada; 4- GMOP₃-EPO-GMOP sin digerir; 5-GMOP₃-EPO-GMOP N-deglicosilada; 6-GMOP₃-EPO-GMOP N,O-deglicosilada; 7-mGMOP₃-EPO-mGMOP sin digerir; 8-mGMOP₃-EPO-mGMOP N-deglicosilada; 9-mGMOP₃-EPO-mGMOP N,O-deglicosilada; 10-MMM. Los recuadros con líneas discontinuas indican las proteínas resultantes del proceso de remoción total de glicanos.

Como se observa, las variantes presentaron una MM aparente que supera a la de la rhEPO, cuya masa se ubicó alrededor de 37 kDa. Si bien la masa molecular de la rhEPO suele encontrarse entre 30 y 34 kDa, en las corridas electroforéticas se ha reportado un rango más amplio, de aproximadamente 30 a 40 kDa (Schmidt y col., 2003). Por su parte, las variantes GMOP₃-EPO-GMOP y mGMOP₃-EPO-mGMOP exhibieron aproximadamente 61 kDa y 63 kDa, respectivamente. La N-deglicosilación de la rhEPO redujo su masa a aproximadamente 19 kDa, evidenciando la remoción de los N-glicanos, y la posterior eliminación de los O-glicanos produjo un leve descenso alrededor de 18 kDa, valor que coincide con la masa aparente reportada para la proteína no glicosilada.

En el caso de las proteínas de fusión, la N-deglicosilación redujo sus MM a aproximadamente 45 kDa para GMOP₃-EPO-GMOP y a 50 kDa para mGMOP₃-EPO-mGMOP, lo que representa una disminución de unos 15 kDa, atribuible a los N-glicanos y similar a la observada para rhEPO (17 kDa).

Luego de la N-deglicosilación, la variante mGMOP₃-EPO-mGMOP presentó una MM mayor que GMOP₃-EPO-GMOP, probablemente debido a un mayor contenido de O-glicanos, en concordancia con la naturaleza de los péptidos de fusión. La O-deglicosilación produjo un descenso de la masa molecular a 33 kDa para GMOP₃-EPO-GMOP y a 35 kDa para mGMOP₃-EPO-mGMOP, manteniéndose una leve diferencia atribuible a la longitud de los

péptidos. Como era esperable, la disminución de la MM luego de la O-deglicosilación fue mucho más pronunciada en las quimeras que en la rhEPO, ya que esta última contiene un solo O-glicano (con un aporte estimado de ~2 kDa), mientras que las proteínas de fusión demostraron una masa adicional cercana a los 15 kDa aportada por los O-glicanos.

3.3.1.2. Isoelectroenfoque

Con el objetivo de comparar el perfil de isoformas de las variantes de fusión con respecto a la rhEPO comercial, se llevó a cabo un IEF. La rhEPO presenta una marcada microheterogeneidad derivada de sus cadenas de carbohidratos unidas por enlaces tipo N, los cuales pueden contener entre dos y cuatro antenas que pueden terminar cada una de ellas en una molécula de ácido siálico, responsables de su carga negativa. En total, la rhEPO puede incorporar hasta 14 residuos de ácido siálico (12 en los N-glicanos y 2 en los O-glicanos), lo que da origen a múltiples isoformas con diferentes puntos isoeléctricos, cada una definida por su número específico de ácido siálico (Amadeo y col., 2004).

La rhEPO comercial se halla enriquecida en sus isoformas más sialiladas, obteniéndose un conjunto restringido de 5 isoformas principales (Fig. 76). En contraste, ambas variantes de fusión mostraron aproximadamente 26 glicofomas, distribuidas a lo largo de todo el gradiente, lo que evidencia una heterogeneidad significativamente superior. Esta mayor dispersión probablemente se deba a la variabilidad de la N-glicosilación, principal fuente de heterogeneidad. La rhEPO comercial (con su contenido de isoformas más ácidas) se localizó en una región más básica que las de las variantes. En particular, mGMOP₃-EPO-mGMOP presentó un conjunto de isoformas con menor pI, acumuladas en la región más ácida del gel y sin resolución definida, probablemente debido a un mayor contenido de ácido siálico, como se observó previamente para mGMOP₃-IFN-mGMOP. Por su parte, GMOP₃-EPO-GMOP mostró una distribución más uniforme a lo largo del gel, sin extenderse hasta la zona más ácida del mismo, lo cual sugiere que el gradiente aplicado fue adecuado para distinguir las diferencias entre ambas variantes.

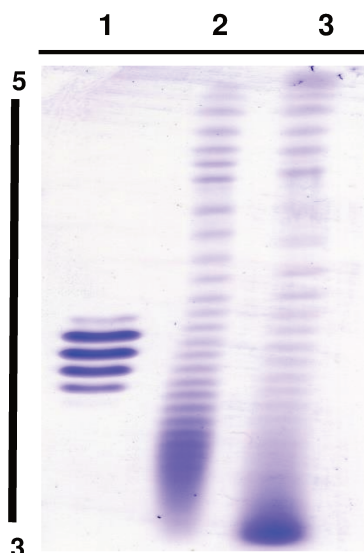


Figura 76: Patrón de isoformas de las variantes de rhEPO evaluado mediante IEF. Calles: 1- rhEPO comercial.; 2- GMOP₃-EPO-GMOP; 3- mGMOP₃-EPO-mGMOP.

3.3.1.3. Dicroísmo circular

Para evaluar el impacto de la fusión de los péptidos GMOP y mGMOP en la estructura secundaria y terciaria de la rhEPO, las variantes fueron analizadas mediante dicroísmo circular, registrándose los espectros en la región del UV lejano (190-240 nm) y UV cercano (250-320 nm).

En la región del UV lejano (Fig. 77), las variantes mostraron un perfil similar al de la rhEPO, con máximos entre 190 y 200 nm y un mínimo negativo a 208 nm, característicos de proteínas con estructuras de hélices- α . También se detectó un mínimo menos pronunciado alrededor de 220 nm, más marcado en la rhEPO, asociado a este tipo de estructura. Sin embargo, las variantes de fusión presentaron menor intensidad en las bandas positivas y mayor en las negativas, lo que sugiere una disminución relativa del contenido de hélices- α , en concordancia con lo observado en las variantes de rhIFN. Esta diferencia podría deberse a la presencia de los péptidos en los extremos, con estructuras más flexibles o desorganizadas.

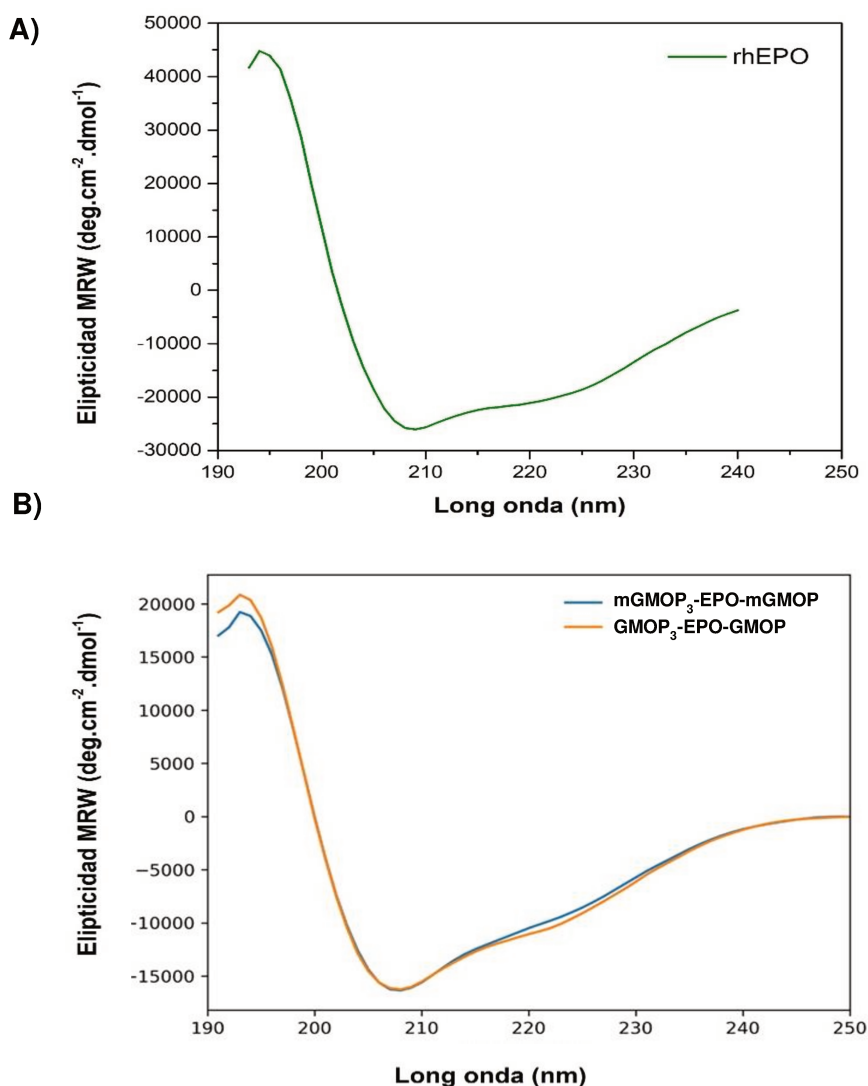


Figura 77: Estructura secundaria de las variantes de rhEPO evaluada mediante dicroísmo circular en el UV lejano. A) rhEPO. B) Variantes de fusión de rhEPO.

En el rango de UV cercano (Fig. 78), las variantes mostraron espectros similares entre sí y con respecto a rhEPO, lo que sugiere que la estructura terciaria global se conserva. No obstante, la variante GMOP₃-EPO-GMOP presentó mayor elipticidad molar entre 270 y 290 nm que mGMOP₃-EPO-mGMOP, región asociada a la absorción de Trp, Tyr y Phe. Dado que las variantes contienen el mismo número de Tyr y Phe (4 de cada una), la diferencia se atribuye principalmente a los Trp: GMOP₃-EPO-GMOP posee 7 Trp, mientras que mGMOP₃-EPO-mGMOP conserva solo los 3 Trp de la estructura nativa de la hEPO (Trp51, Trp64 y Trp88). De estos, el Trp88 presenta una señal atenuada por interacciones de Van der Waals con el puente disulfuro Cys29–Cys33, por lo que la contribución dominante proviene de Trp51 y Trp64, próximos a los sitios de unión al receptor (Deechongkit y col., 2006). La forma amplia de las bandas entre 270 y 280 nm no cambió significativamente, lo que indica que los residuos aromáticos permanecen en entornos estructurales similares.

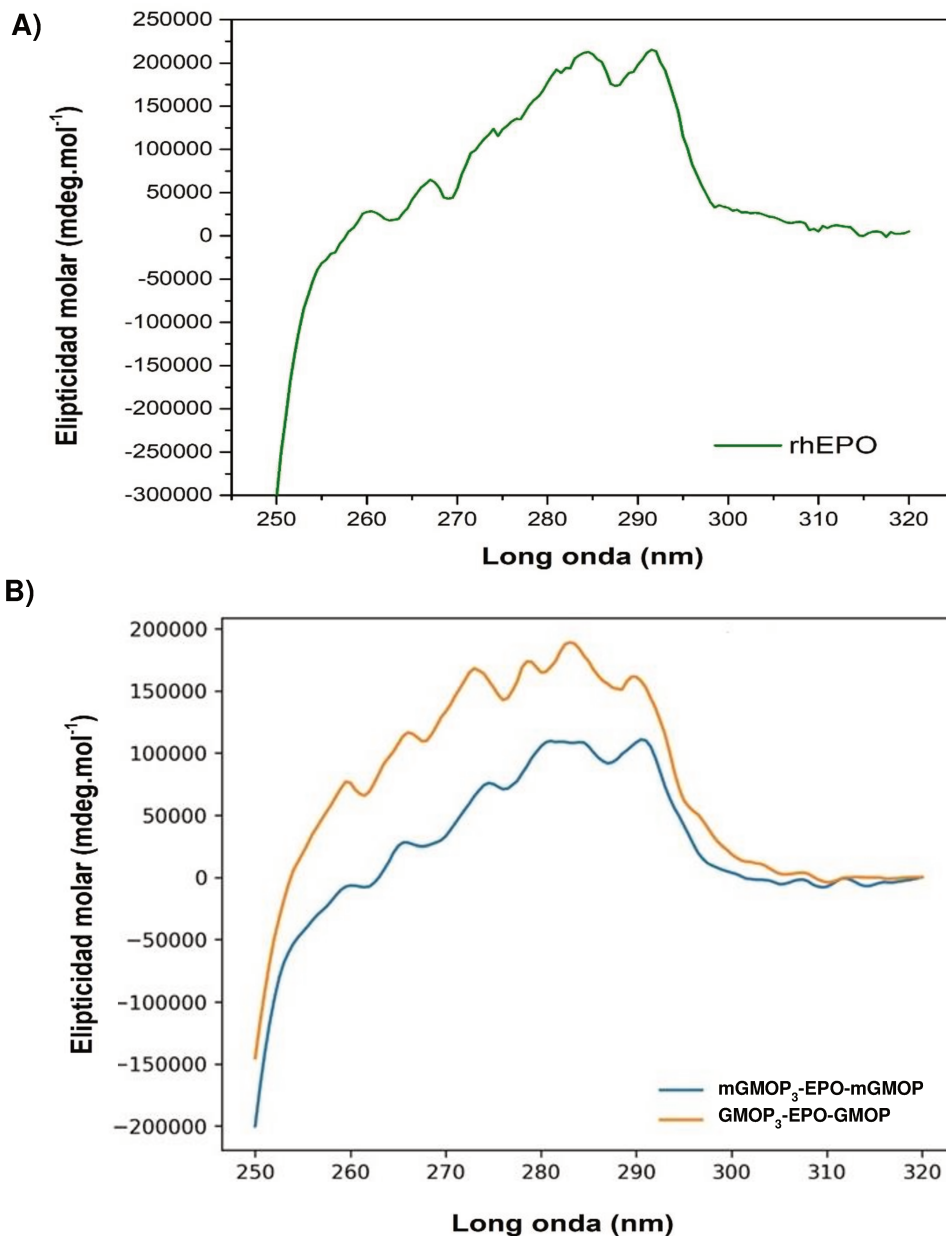


Figura 78: Análisis de la estructura terciaria de las variantes de rhEPO mediante dicroísmo circular en el UV cercano. A) rhEPO. B) Variantes de fusión de rhEPO.

La mayor elipticidad observada en GMOP₃-EPO-GMOP se explica principalmente por su mayor número de Trp, aunque esta contribución no es completamente aditiva, ya que los Trp ubicados en regiones más flexibles o expuestas generan una señal menos intensa que aquellos en regiones rígidas y bien definidas de la proteína.

En comparación con la rhEPO, que presenta la mayor elipticidad molar en el rango de 270-290 nm pese a poseer solo 3 Trp, se evidencia que la intensidad en el UV cercano depende principalmente del entorno estructural de los residuos aromáticos y no de su número. En la rhEPO nativa, los Trp se ubican en regiones rígidas y menos expuestas, generando una señal más intensa. En cambio, en las variantes de fusión, la incorporación de los péptidos podría aumentar la flexibilidad en los extremos, ubicando los Trp adicionales del péptido GMOP en

zonas más móviles y, por ende, con menor contribución a la señal (Arakawa, y col., 2001). En conjunto, estos resultados indicarían que las variantes de rhEPO conservaron la integridad de su estructura tridimensional (Lah y col., 2005).

3.3.1.4. Thermal shift assay

La rhEPO ha sido previamente caracterizada mediante el ensayo de *thermal shift*, determinándose que se trata de una molécula termodinámicamente inestable, con una T_m de aproximadamente 53 °C, un valor bajo en comparación con otras proteínas globulares (Arakawa, y col., 2001). Con el fin de evaluar si la fusión de los péptidos modifica esta propiedad, las variantes de rhEPO se analizaron en un rango de 20-90 °C, empleando la rhEPO comercial como control. La T_m se determinó a partir del ajuste global no lineal de los datos experimentales (Fig. 79).

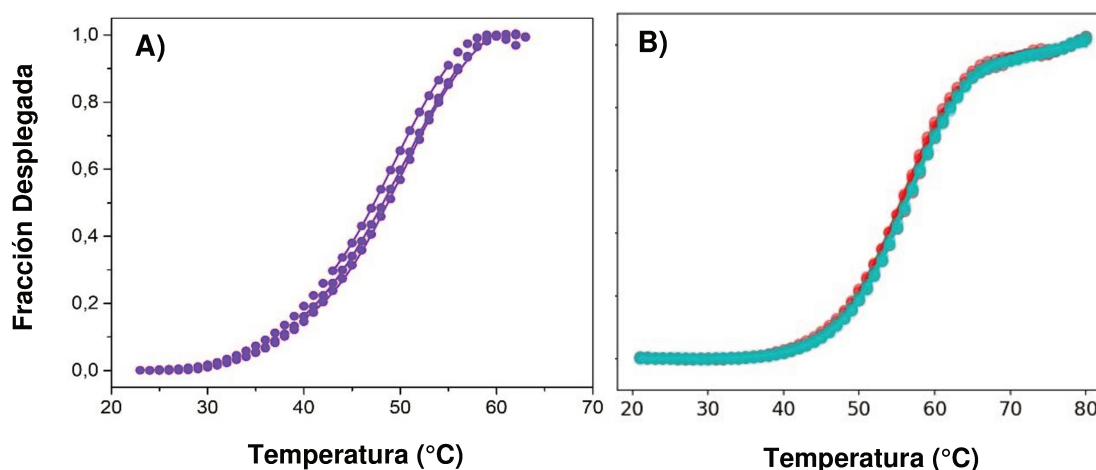


Figura 79: Estabilidad térmica de las variantes de hEPO evaluada mediante análisis de *thermal shift*. A) rhEPO ($T_m = 50,1 \pm 0,4$) °C; B) GMOP₃-EPO-GMOP ($T_m = 55,8 \pm 0,4$) °C (rojo) y mGMOP₃-EPO-mGMOP ($T_m = 56,2 \pm 0,1$) °C (azul). Las mediciones se realizaron por triplicado.

Ambas variantes mostraron un comportamiento térmico similar al de la rhEPO, lo que sugiere que conservaron su estructura tridimensional, en concordancia con lo observado por dicroísmo circular. Sin embargo, las curvas se desplazaron hacia mayores temperaturas, reflejando un incremento en la estabilidad térmica. Las variantes presentaron un T_m promedio de 56 °C, significativamente superior a la de rhEPO ($T_m = 50$ °C), sin diferencias significativas entre ellas. Al igual que para las variantes de rhIFN, la incorporación de los péptidos incrementó la estabilidad conformacional de la proteína nativa, probablemente debido a nuevas interacciones intra o intermoleculares que estabilizan su estructura. Cabe destacar que el incremento observado para rhEPO ($\Delta T_m \approx 6$ °C) fue incluso mayor que el observado para las variantes de rhIFN ($\Delta T_m \approx 3$ °C). Este aumento en la T_m indica una mayor estabilidad de la proteína que, aunque superior a la temperatura fisiológica, sirve para discutir acerca de su estabilidad y podría

predecir un desplegado parcial o global a 37 °C. Estos resultados refuerzan el potencial de los péptidos como herramienta para mejorar la estabilidad térmica no sólo del rhIFN, sino también de proteínas cuya estabilidad es fuertemente dependiente de las condiciones del entorno, como la rhEPO.

3.3.2. Caracterización biológica *in vitro*

La determinación de la AB y su correlación con el comportamiento clínico es un aspecto clave en la evaluación de la calidad de las glicoproteínas terapéuticas. Los estudios *in vivo* se han utilizado habitualmente para evaluar la bioactividad; sin embargo, también se requieren métodos alternativos que simplifiquen estos bioensayos y proporcionen resultados preliminares antes de la evaluación *in vivo* (Metta y col., 2017).

En el caso de la rhEPO, los bioensayos *in vitro* miden la capacidad de la citoquina para inducir la proliferación o diferenciación celular sobre células eritroides en cultivo durante períodos cortos. Se han utilizado células eritroides derivadas del bazo, médula ósea e hígado fetal de ratones. Sin embargo, las líneas celulares eritroides establecidas han adquirido mayor relevancia por su conveniencia, reproducibilidad y facilidad de manipulación. La estimación de la actividad de la rhEPO se ha realizado mediante ensayos basados en diferentes líneas celulares, incluyendo AS-E2, TF1, Ba/F3-EPOR, UT-7 y UT-7/EPO. Esta última ha sido recomendada por la OMS como línea de referencia para ensayos de proliferación *in vitro*, aunque pueden utilizarse otras siempre que estén validadas (Dalmora y col., 2003). En efecto, la línea TF-1 sigue siendo aún ampliamente empleada, dado que fue una de las primeras utilizadas para evaluar la actividad eritropoyética de rhEPO.

3.3.2.1. Actividad biológica eritropoyética *in vitro*

De forma análoga a lo realizado para las moléculas de rhIFN, se evaluó la AB de las muteínas de rhEPO purificadas por CIA, con el fin de analizar el impacto de la incorporación de los péptidos conteniendo O-glicanos en su actividad eritropoyética.

Para ello, se realizaron ensayos de proliferación celular utilizando dos líneas hematopoyéticas dependientes de factores de crecimiento disponibles en el laboratorio: TF-1 y UT-7/EPO. La supervivencia y proliferación de estos linajes celulares dependen de la presencia de hEPO en el medio de crecimiento. La línea UT-7/EPO presenta un elevado número de receptores para hEPO (7.200 a 13.000 por célula) y es considerada uno de los sistemas humanos más sensibles y específicos para estudiar la expresión y función del EPOR (Metta y col., 2017), por lo que fue seleccionada como línea principal. Complementariamente, se utilizó la línea TF-1, para corroborar la consistencia funcional de las variantes en diferentes contextos celulares. Con los valores de concentración, se calcularon las ABE de cada muestra en cada línea celular (Figura 80).

Los análisis estadísticos se realizaron de acuerdo con las características de distribución de los datos. En la línea celular TF-1, la respuesta presentó una distribución asimétrica, por lo que se aplicó la prueba de Mann-Whitney, sin observarse diferencias significativas entre las variantes. En cambio, los datos obtenidos con la línea UT-7/EPO cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, permitiendo la utilización de un test-t para muestras independientes, el cual tampoco reveló diferencias significativas entre las muteínas.

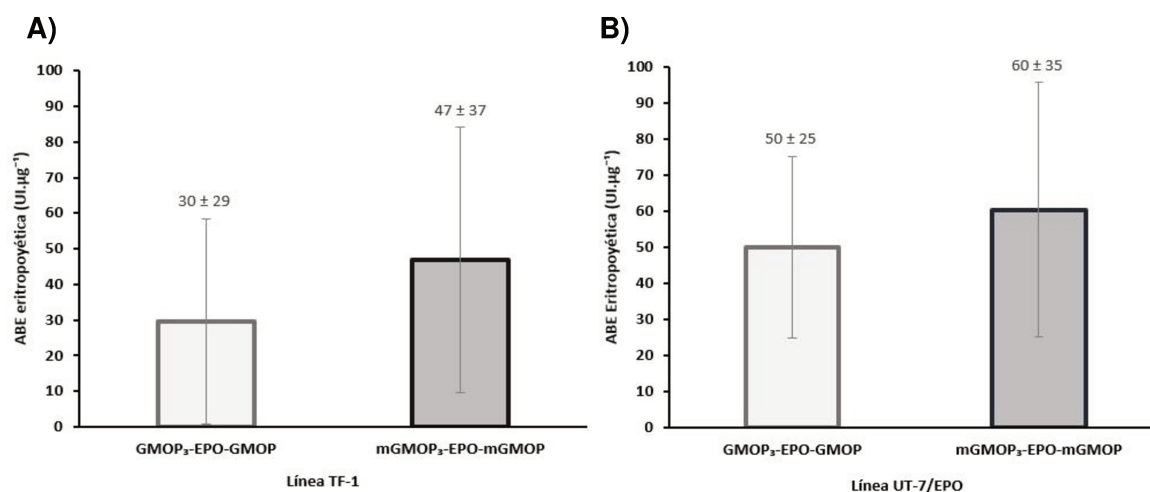


Figura 80: Determinación de la ABE eritropoyética de las variantes GMOP₃-EPO-GMOP y mGMOP₃-EPO-mGMOP. La evaluación se realizó en dos líneas diferentes: **A)** TF-1 y **B)** UT-7/EPO. Los gráficos representan el promedio de los resultados ± SD (n=11).

De esta manera, las variantes mostraron niveles de actividad eritropoyética comparables entre sí y entre las dos líneas celulares, sin diferencias significativas según el análisis global mediante Kruskal-Wallis. Aunque se observó una leve tendencia hacia una mayor respuesta en la línea UT-7/EPO, dicha diferencia no alcanzó significancia estadística, probablemente debido a la alta variabilidad experimental y al tamaño de muestra limitado. Esta tendencia podría relacionarse con la mayor sensibilidad de la línea UT-7/EPO frente a la rhEPO, atribuida a la alta expresión del receptor clásico y a la menor dependencia de otras citoquinas, lo que se ha asociado a una potencia hasta cuatro veces superior respecto de TF-1 (Mattio y col., 2011).

Considerando que la ABE de rhEPO reportada por el proveedor (Zelltek SA) es de 128 UI.µg⁻¹, las variantes de fusión conservaron entre un 30 y 40% de la actividad eritropoyética *in vitro*. Este nivel, aunque reducido, sigue siendo funcionalmente relevante con relación a las modificaciones estructurales introducidas. La disminución observada podría atribuirse a la hiperglicosilación inducida por la incorporación de los péptidos, dado que se ha demostrado que un mayor contenido de carbohidratos y de ácido siálico terminal puede interferir en la interacción EPO-EPOR, ya sea mediante el enmascaramiento de regiones de la hEPO críticas para la unión al receptor, la generación de impedimentos estéricos, o la alteración de fuerzas electrostáticas involucradas (Egrie y Browne, 2001). En concordancia con este modelo, cabría

esperar una menor ABE de la variante más glicosilada y, por ende, más sialilada (mGMOP₃-EPO-mGMOP); sin embargo, los resultados mostraron una tendencia inversa, la cual no resultó significativa, lo que sugiere que ambas proteínas presentan un comportamiento funcional equivalente bajo las condiciones ensayadas. En conjunto, los resultados indican que las modificaciones realizadas no anularon la capacidad para estimular la proliferación celular, al tiempo que sugieren que podrían conferir ventajas estructurales asociadas a una mayor estabilidad y mejor desempeño *in vivo*.

3.3.2.2. Estabilidad plasmática

La elección de la vía de administración de una proteína terapéutica depende tanto de la molécula como de la indicación clínica. Entre las más frecuentes para rhEPO se encuentran la intravenosa y la subcutánea, donde la degradación proteolítica sérica representa un factor crítico. En este contexto, se evaluó la estabilidad de las nuevas variantes de rhEPO frente a las proteasas presentes en plasma humano, en comparación con la rhEPO. La evolución de la actividad eritropoyética remanente se analizó a lo largo del tiempo (0-168 h), mediante la línea UT7/EPO, determinándose el tiempo correspondiente al 50% de la AB remanente en cada curva (Fig. 81).

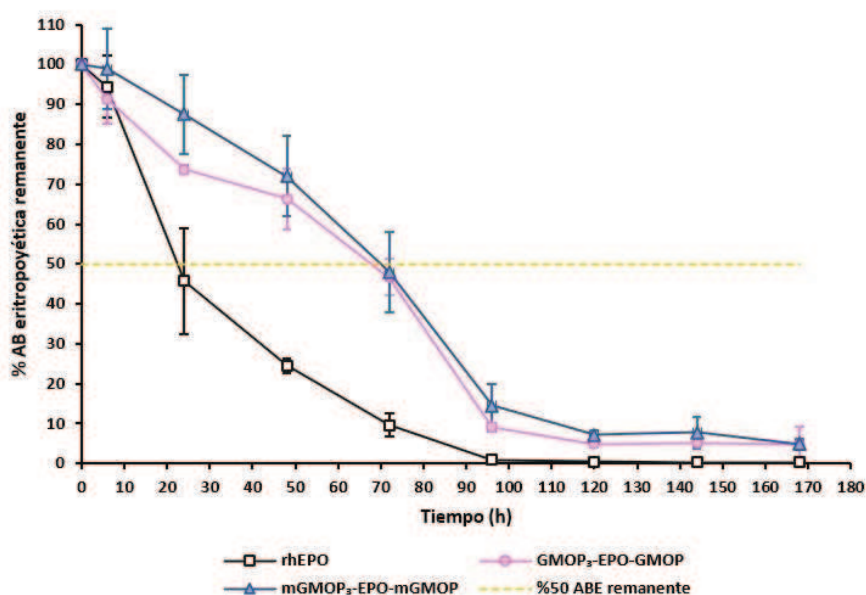


Figura 81: Estabilidad de las variantes de rhEPO en plasma humano. Se muestra el porcentaje de AB eritropoyética remanente luego del período de incubación en función de dicho tiempo. Las barras de error corresponden a la desviación estándar del ensayo valoración biológica eritropoyética (n=3). No se realizaron réplicas independientes del ensayo.

Los resultados obtenidos muestran que la rhEPO sin modificar conserva el 50% de su actividad hasta las $22,4 \pm 0,4$ h, mientras que las variantes alcanzan dicho valor a las 70 ± 4 h (GMOP₃-EPO-GMOP) y 74 ± 6 h (mGMOP₃-EPO-mGMOP). Estos valores representan un

aumento de aproximadamente 3 veces en la resistencia frente a proteasas, similar a lo obtenido para las muteínas de rhIFN. En el caso de la rhEPO, la pérdida de la actividad ocurre de manera rápida durante las primeras horas de incubación, mientras que las variantes mantienen niveles detectables de actividad durante un período considerablemente más prolongado. De esta manera, ambas variantes conservaron alrededor del 10% de actividad al final del ensayo (168 h), mientras que la rhEPO perdió completamente su actividad luego de 100 h.

La mayor estabilidad frente a proteasas observada en las variantes de rhEPO podría explicarse por un mecanismo similar al descrito para las de rhIFN: la glicosilación conferiría resistencia a la degradación a temperatura fisiológica, ya sea mediante el enmascaramiento de sitios de clivaje o la generación de impedimentos estéricos que dificultan el acceso de las enzimas. Haciendo una analogía con los resultados obtenidos para rhIFN, esta mayor estabilidad podría traducirse en una vida media más prolongada y, por ende, en un perfil farmacocinético más favorable.

3.3.3. Farmacocinética en animales de experimentación

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para las variantes de rhIFN, donde se evidenció que los O-glicanos introducidos por los péptidos de fusión mejoran los parámetros farmacocinéticos, se realizaron estudios *in vivo* con las variantes de rhEPO con el propósito de corroborar si las diferencias observadas en su perfil de carbohidratos, particularmente el incremento en el contenido de ácido siálico, también se traducen en una vida media prolongada. Para tal fin, se administró una dosis de 100 µg de cada variante o de rhEPO sin modificar, por vía intraperitoneal en animales de experimentación. La concentración plasmática a diferentes tiempos postinoculación se determinó mediante ELISA (Fig. 82).

Los perfiles farmacocinéticos correspondientes a cada variante se extendieron hacia tiempos más prolongados que los observados para el IFN-wt, debido a la presencia de los N-glicanos propios de la rhEPO, que se suman a los O-glicanos introducidos por medio de los péptidos.

El comportamiento farmacocinético de las moléculas fue modelado mediante el *software* Monolix. Del mismo modo que para las variantes de rhIFN, los datos se ajustaron a un modelo sin retardo y con absorción de primer orden para el caso de rhEPO y GMOP₃-EPO-GMOP, y a un modelo de tránsito con absorción de primer orden para mGMOP₃-EPO-mGMOP. En todos los casos, se asumió una distribución en un único compartimento y una eliminación lineal de primer orden. A partir de los modelos seleccionados, se calcularon los parámetros farmacocinéticos (Tabla 24).

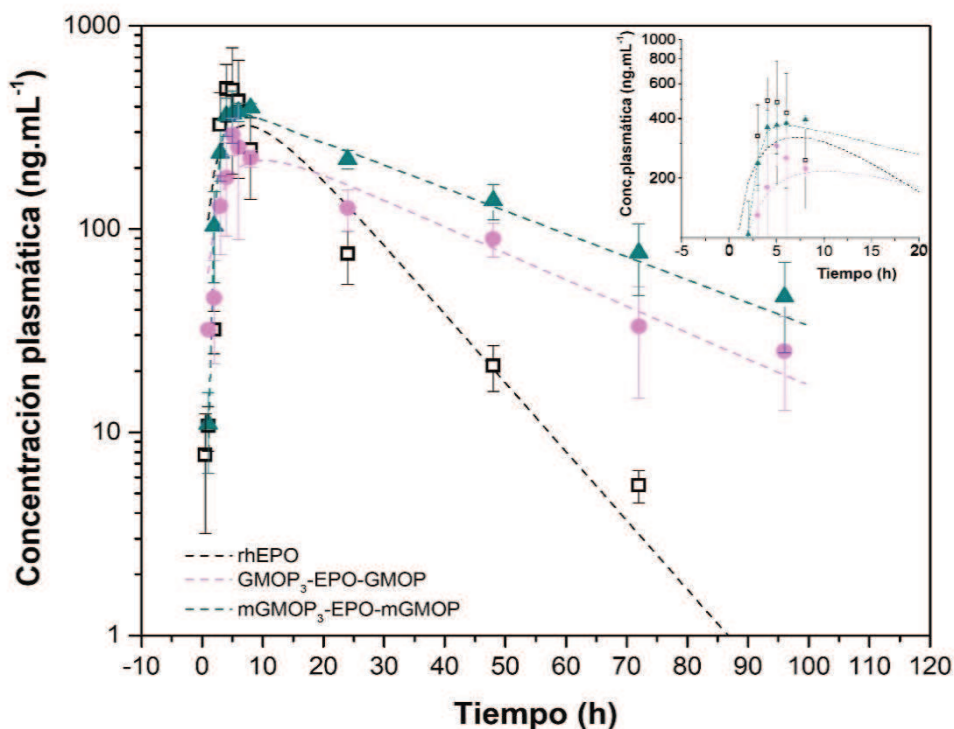


Figura 82: Perfil farmacocinético de las variantes hiper-O-glicosiladas de rhEPO en animales de experimentación. Se graficó la concentración plasmática de rhEPO, GMOP₃-EPO-GMOP y mGMOP₃-EPO-mFMOP en función del tiempo transcurrido desde la inyección. Los resultados muestran el valor promedio ± SD (n=4). En la parte superior se observa una ampliación de los picos de concentración plasmática.

Tabla 24: Parámetros farmacocinéticos de las variantes de rhEPO luego de la inyección intraperitoneal en ratas

	T _{Máx} (h)	C _{Máx} (ng.mL ⁻¹)	t _{1/2} elim (h)	AUC (ng.h.mL ⁻¹)	Cl _{app} (mL.h ⁻¹)
rhEPO	7,0 ± 0,6 ^A	340 ± 48 ^A	8,9 ± 0,1 ^A	6.227 ± 626 ^A	27 ± 2 ^A
GMOP ₃ -EPO-GMOP	10,1 ± 0,2 ^B	220 ± 4 ^B	23,4 ± 0,4 ^B	9.411 ± 206 ^B	10,6 ± 0,2 ^B
mGMOP ₃ -EPO-mGMOP	5,9 ± 0,9 ^C	378 ± 32 ^A	30 ± 6 ^C	15.601 ± 2.095 ^C	6,5 ± 0,5 ^C

Los parámetros fueron calculados para cada animal y se expresan como el valor promedio ± SD (n=8). Las letras diferentes dentro de la misma columna (A, B y C) representan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (p< 0,05).

Los parámetros obtenidos muestran un notable incremento de la vida media en circulación para las variantes de fusión: 2,6 veces para GMOP₃-EPO-GMOP y 3,4 veces para mGMOP₃-EPO-mGMOP respecto a la molécula comercial rhEPO. El mayor incremento en el tiempo de vida media de mGMOP₃-EPO-mGMOP puede estar dado por un mayor contenido de ácido siálico ya que ha sido demostrado que existe una correlación positiva entre este aspecto y el tiempo de vida media en circulación (Egrie y Browne, 2001). Este incremento es comparable al reportado en la bibliografía para darbepoetina alfa (Aranesp®), cuya vida media es aproximadamente 3 veces mayor que la rhEPO en ratas y perros después de ser inyectada (Ibbotson y Goa, 2001). En coincidencia, Fares y col. (2011) describieron tiempos de vida

media de 11 h para Aranesp® y de 13 h para EPO-(CTP)₃, en comparación con las 4 h determinadas para rhEPO luego de su administración intravenosa en ratones ICR.

El Cl_{app} también disminuyó en ambas variantes con respecto a la rhEPO comercial, alrededor de 2,5 veces para GMOP₃-EPO-GMOP y 4 veces para mGMOP₃-EPO-mGMOP. Del mismo modo que para rhIFN, la molécula fusionada a mGMOP exhibió valores superiores a los de la variante fusionada a GMOP, e incluso mayores a los reportados para darbepoetina, cuyo *clearance* fue 3,7 veces menor que el de rhEPO (Egrie y col., 2003). De manera consistente, el incremento de la AUC podría indicar una mayor exposición sistémica, asociada al incremento del tamaño molecular y del contenido de glicanos cargados a pH fisiológico.

En cuanto a la fase de absorción, los resultados mostraron comportamientos dispares. Por un lado, GMOP₃-EPO-GMOP exhibió una absorción más lenta que la de la rhEPO sin modificar, pero un $T_{m\acute{a}x}$ aproximadamente el doble al observado para la variante fusionada a mGMOP. Esta menor velocidad de absorción con respecto a la molécula nativa podría atribuirse al incremento en el tamaño hidrodinámico y al mayor grado de glicosilación conferido por los péptidos de fusión, factores que pueden retrasar la difusión desde el sitio de administración y, en consecuencia, el ingreso a la circulación sistémica. En contraste, la variante mGMOP₃-EPO-mGMOP evidenció una absorción más rápida ($T_{m\acute{a}x} = 5,9 \pm 0,9$) en comparación con las demás moléculas, alcanzando también una $C_{m\acute{a}x}$ superior. Este comportamiento, aparentemente contrario al esperado considerando su mayor glicosilación, podría deberse al modelo farmacocinético aplicado, el cual contempla compartimentos de tránsito posteriores a la fase de absorción. En este caso, parte del proceso de absorción podría estar representado en dichos compartimentos, resultando en un $T_{m\acute{a}x}$ estimado artificialmente menor.

En conjunto, los resultados farmacocinéticos evidencian que, al igual que lo ocurrido con rhIFN, las fusiones peptídicas impactan de manera significativa tanto en la fase de eliminación como en la de absorción de la rhEPO, lo cual, potencialmente, podría traducirse en una mayor actividad biológica *in vivo*, como se evalúa en la sección siguiente.

Un aspecto muy importante para considerar en los estudios farmacocinéticos es la composición de isoformas de las muestras inoculadas a los animales. En el caso de las moléculas hiperglicosiladas se empleó un sistema de purificación mediante CIA con un anticuerpo como ligando que a priori, permitiría recuperar la totalidad de las isoformas tal como se observa en el IEF (Fig. 76). Esta particularidad determina que la muestra inoculada se componga de mezcla de isoformas que tendrán un comportamiento farmacocinético diferente unas de otras. Por este motivo es para destacar que, si se hubiese inoculado muestras conteniendo el conjunto de isoformas más ácidas de cada variante del mismo modo que ocurre con la rhEPO comercial, los resultados farmacocinéticos hubiesen sido mucho más favorables que los ya obtenidos para dichas variantes. Incluso se podría haber observado en mayor proporción las diferencias

existentes entre ambas muteínas. Este aspecto que se comenta forma parte de una acción futura a evaluar para perfilar las moléculas como candidatos terapéuticos.

3.3.4. Actividad biológica *in vivo*

Como se mencionó anteriormente, tanto la presencia de carbohidratos como el contenido de ácido siálico terminal son determinantes al evaluar la actividad biológica *in vivo* de la hEPO. Por un lado, la adición de los glúcidos es necesaria para la correcta biosíntesis, secreción, estabilidad y actividad de la hormona. Por otro lado, el ácido siálico es decisivo, ya que un mayor contenido de este residuo se asocia con una vida media más prolongada en circulación (Byrne y col., 2007). En este contexto, resulta relevante evaluar el comportamiento *in vivo* de las variantes generadas para determinar en qué medida la fusión de los péptidos modifica la actividad de la hEPO y, además, si existen diferencias entre las moléculas de fusión. Los bioensayos *in vivo* clásicos para hEPO se basan en su capacidad para estimular la eritropoyesis luego de su administración en ratas o ratones. Estos animales pueden ser previamente tratados para inducir estados de policitemia (sometidos a condiciones de hipoxia, hemorragias o exposición a drogas citotóxicas) o evaluados en estado normal (normocitémicos). La respuesta hematopoyética se determina habitualmente por la incorporación de hierro radioactivo en los eritrocitos o por recuento de reticulocitos mediante microscopía o citometría de flujo.

En este trabajo, se evaluó el efecto *in vivo* de las variantes de rhEPO para incrementar el hematocrito en ratones normocitémicos, empleando la metodología propuesta por la *European Pharmacopoeia* 10.0. (2025) para la determinación de la potencia de soluciones de rhEPO concentrada. El uso de ratones normocitémicos permite estimar la actividad biológica intrínseca de las variantes de rhEPO sin la influencia de estímulos externos. Las determinaciones se realizaron en el CMC y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 25.

Tabla 25: Actividad hematopoyética *in vivo* (UI.µg⁻¹) de las variantes de rhEPO en ratones normocitémicos

GMOP₃-EPO-GMOP	mGMOP₃-EPO-mGMOP
(UI.µg⁻¹)	(UI.µg⁻¹)
329 ± 31	295 ± 29

La evaluación de la actividad biológica *in vivo* evidenció un incremento en el porcentaje de reticulocitos tras una única inyección para las variantes de fusión, en comparación con la rhEPO no modificada reportada por el proveedor (Zelltek) y utilizada como referencia. Mientras que esta última presenta una actividad específica de 128 UI.µg⁻¹, las variantes exhibieron una potencia aproximadamente 2,5 veces superior. Este incremento podría atribuirse al aumento de estabilidad y a la reducción en la depuración plasmática conferidos por la glicosilación

adicional, los cuales favorecen una mayor exposición sistémica y, por ende, un efecto biológico más pronunciado.

Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las dos variantes de fusión, a pesar de que la molécula fusionada al péptido mGMOP presenta un mayor contenido de glicanos con relación a GMOP₃-EPO-GMOP. Esto podría indicar que, en un contexto hiperglicosilado, el efecto global respecto a la molécula no modificada es lo suficientemente marcado como para enmascarar diferencias sutiles en el grado de glicosilación. Esta interpretación resulta consistente con lo observado para las variantes hiper-O-glicosiladas de rhIFN, en las cuales tampoco se detectaron diferencias en la actividad *in vitro* e *in vivo*, aun cuando los péptidos aportaban distintos niveles de glicosilación. No obstante, las diferencias observadas en los parámetros farmacocinéticos de las variantes de rhEPO refuerzan los resultados obtenidos con rhIFN, sugiriendo la existencia de un efecto diferencial que no se reflejó en la potencia *in vivo*, probablemente como consecuencia del diseño experimental y del ajuste de dosis requerido para la comparación entre variantes.

Cabe destacar que este ensayo se realizó bajo un esquema de administración única, sin considerar los parámetros farmacocinéticos previamente determinados. Por lo tanto, es posible que las diferencias entre las variantes se evidencien en estudios con dosis repetidas, ajustadas en función del tiempo de vida media de cada molécula. En este sentido, serán necesarios ensayos adicionales que permitan comparar distintos esquemas de dosis y frecuencia, con el fin de determinar su equivalencia biológica y optimizar su uso terapéutico. De la misma manera que lo indicado anteriormente en la sección de los ensayos farmacocinéticos, el grado de heterogeneidad de isoformas de diferente carga de ambas muestras podría enmascarar los resultados, puesto que las masas inoculadas fueron iguales pero la proporción de isoformas diferentes. A la luz de estos resultados, se evidenciaron mejoras relevantes con respecto al producto comercial; sin embargo, será necesario aislar el conjunto de isoformas más ácidas de cada variante para contrastar su comportamiento real en condiciones comparables, es decir, bajo una composición equivalente en términos de isoformas ácidas.



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

La producción de proteínas recombinantes constituye una de las áreas más dinámicas y estratégicas de la biotecnología moderna. A lo largo de las últimas décadas, el desarrollo de proteínas terapéuticas ha transformado la práctica médica en diversos campos. Sin embargo, muchas de estas moléculas presentan limitaciones importantes que restringen su eficacia clínica. Entre ellas se destacan la baja estabilidad estructural, la susceptibilidad a la proteólisis, la corta vida media en circulación y, en algunos casos, una respuesta inmune indeseada del organismo receptor. A estos problemas, se suman desafíos con el proceso de desarrollo y producción, donde la purificación, detección y caracterización constituyen pasos críticos que impactan en la calidad final del producto bioterapéutico. En este contexto, las estrategias de ingeniería de proteínas han buscado incorporar modificaciones que permitan mejorar las propiedades biológicas, así como también las cuestiones operativas de las moléculas recombinantes. Entre las cuales, el uso de etiquetas peptídicas o *tags* hace tiempo adquirió especial relevancia. Estas secuencias cortas pueden cumplir múltiples funciones: facilitar la purificación por afinidad, incrementar la expresión o solubilidad, reducir la agregación y, en algunos casos, modular la actividad o la vida media de la proteína. Dentro de estas estrategias, el *epitope tagging* resulta particularmente útil cuando no existen anticuerpos específicos contra la forma nativa de la proteína. A pesar de su amplio empleo como herramientas de laboratorio, la mayoría de los sistemas existentes están optimizados para cumplir una determinada función y no aportan simultáneamente valor analítico y farmacológico.

Bajo este enfoque y a partir de un trabajo pionero en nuestro laboratorio que identificó un epítipo lineal derivado del hGM-CSF mediante la generación de un mAb, denominado CC1H7, se diseñaron las etiquetas GMOP y mGMOP. Estas secuencias contienen, respectivamente, cuatro y seis sitios potenciales de O-glicosilación, junto con el epítipo APARSPS. En nuestro laboratorio se demostró previamente que la interacción entre el anticuerpo y su epítipo es influenciada por la fuerza iónica. Esta combinación les confiere a las etiquetas diseñadas una bifuncionalidad singular: por un lado, los glicanos introducen un componente estructural y funcional capaz de modificar las propiedades farmacológicas de la proteína fusionada; y por otro, el epítipo aporta la posibilidad de desarrollar herramientas de reconocimiento inmunoquímico para la detección, cuantificación y purificación mediante el empleo del mAb CC1H7.

Estudios previos del laboratorio demostraron que la fusión de GMOP o mGMOP al hIFN conduce a un aumento de su MM y del contenido de ácido siálico, sin alterar significativamente la AAV *in vitro*, aunque con una reducción en la AAP. Estos resultados sugieren que el

incremento de glicosilación podría alterar la afinidad por el receptor del IFN, afectando más marcadamente la señalización antiproliferativa, mientras que la respuesta antiviral se mantiene menos dependiente de esta interacción. A nivel farmacocinético, ambas variantes presentaron un comportamiento mejorado respecto del IFN-wt, evidenciado por un aumento de la vida media y una disminución del *clearance* aparente. Sin embargo, en ese mismo trabajo, la etiqueta mGMOP, a pesar de poseer dos sitios adicionales de glicosilación, no exhibió mejoras sustanciales con respecto a la etiqueta GMOP.

A partir de estos antecedentes, en este trabajo se abordaron de manera integrada tres ejes principales vinculados al diseño y aplicación de etiquetas bifuncionales:

1. Su aplicación como herramientas operativas para purificación, detección y cuantificación de proteínas recombinantes.
2. Su capacidad para mejorar propiedades biológicas y farmacocinéticas del rhIFN- α 2b en un contexto de hiper-O-glicosilación, evaluando si, bajo estas condiciones, se observan diferencias entre los efectos producidos por las distintas etiquetas.
3. La extensión y validación de estos efectos en una segunda proteína modelo (rhEPO), analizando si la mejora en la farmacocinética o la afinidad por el receptor resulta determinante en la potencia biológica *in vivo*.

Para la puesta a punto de las herramientas analíticas se trabajó con el sistema mGMOP-mAb CC1H7, empleando la variante mGMOP-IFN, obtenida previamente en el laboratorio, y la muteína mGMOP₃-IFN-mGMOP. El mAb CC1H7, uno de los insumos fundamentales de esta tesis, se obtuvo a partir del cultivo del hibridoma productor, el cual fue adaptado exitosamente a condiciones de cultivo en suspensión y libres de suero. Este enfoque permitió reemplazar la producción original mediante ascitis por un procedimiento de elección desde el punto de vista ético, así como también en cuanto a la reproducibilidad y la escalabilidad.

Posteriormente, se desarrolló un protocolo de CIA empleando dicho mAb. Considerando que la interacción epítipo-anticuerpo se ve fortalecida en presencia de sales, se implementó un DoE para evaluar diferentes tipos y concentraciones de sales y pH, buscando como respuesta la condición que permitiera maximizar la afinidad. Entre las sales evaluadas, se destacó el Na₂SO₄ (1 M, pH 8) que incrementó significativamente la afinidad (6 veces para mGMOP-IFN y de 8 veces para mGMOP₃-IFN-mGMOP) y permitió aumentar la capacidad de unión a la resina de inmunoafinidad (227 μ g de mGMOP-IFN por mL de resina y de 133 μ g de mGMOP₃-IFN-mGMOP por mL de resina, un incremento de 3,5 veces con relación a la condición sin sal). La evaluación de diferentes soluciones eluyentes permitió definir la condición de fosfato 50 mM a pH 11. La disminución de la fuerza iónica y el aumento de pH se correlacionaron con procedimientos de purificación con altos niveles de recuperación (95-100%) y de pureza (89-99%).

Complementariamente, se desarrolló un ELISA de competición para cuantificar proteínas portadoras de la etiqueta mGMOP. El método fue optimizado mediante un segundo DoE, definiendo condiciones que maximizaran la sensibilidad y reproducibilidad del ensayo, utilizando la mínima cantidad de proteína para la sensibilización y la mayor dilución posible del conjugado. La validación del método confirmó su aplicabilidad tanto en diluyente como en medio de cultivo, con valores adecuados LOD y LOQ, buena exactitud y una variabilidad dentro de los rangos aceptables. Asimismo, se comprobó la utilidad del mAb CC1H7 como herramienta de detección mediante *western blot*, donde ambas variantes de rhIFN fueron reconocidas con alta especificidad y un LOD en el orden de ng.

Todos estos resultados fueron validados con las variantes de rhEPO, las cuales fueron purificadas por el protocolo establecido, alcanzando recuperaciones globales del 100% y purezas del 96-99%. El ELISA de competición se aplicó exitosamente a la variante mGMOP₃-EPO-mGMOP, obteniendo valores de LOD, LOQ y SEN comparables a los definidos para las variantes de rhIFN, junto con buena exactitud y reproducibilidad, con valores de CV% dentro de los rangos aceptables. Ambas variantes derivadas de rhEPO fueron además detectadas por el mAb CC1H7 mediante *western blot*.

En conjunto, estos resultados consolidan el potencial del sistema mGMOP-CC1H7 como una plataforma analítica integral, capaz de adaptarse a diferentes formatos (purificación, cuantificación y detección), y caracterizada por su eficiencia y alta especificidad en el reconocimiento del epítopo fusionado a diferentes proteínas.

La evaluación funcional y la validación de las etiquetas GMOP y mGMOP en proteínas modelo permitieron establecer el alcance de estas estrategias de O-glicoingeniería, tanto en la mejora de las propiedades farmacocinéticas como en la estabilidad y el comportamiento biológico de las proteínas recombinantes. Los resultados obtenidos para las variantes fusionadas al hIFN y a la hEPO constituyen un marco comparativo para analizar el efecto diferencial de la glicosilación inducido por cada una de las etiquetas y la repercusión de los distintos grados de O-glicosilación sobre las propiedades estructurales y funcionales de proteínas de interés terapéutico. De esta forma, se pudo concluir que ambas etiquetas son capaces de aumentar el contenido de glicanos y conferir una mayor estabilidad térmica y proteolítica, sin alterar la integridad estructural ni el correcto plegamiento de las moléculas. Tanto para hIFN como para hEPO, el incremento en la MM aparente y la presencia de isoformas más ácidas confirmaron la profusa incorporación de O-glicanos. En particular, las diferencias observadas entre GMOP₃-IFN-GMOP y mGMOP₃-IFN-mGMOP, reflejadas por el desplazamiento más pronunciado hacia pH ácido y una mayor proporción de Neu5Ac en esta última, demostraron que la existencia de dos sitios adicionales de potencial O-glicosilación por cada etiqueta mGMOP se tradujo en un contenido superior de O-glicanos. El aumento de la densidad glicosídica no afectó la estructura secundaria ni terciaria ni de las variantes de rhIFN ni de las

de rhEPO, que conservaron la conformación α -helicoidal característica, pero sí tuvo un impacto positivo sobre su estabilidad. Las mediciones de T_m mediante *thermal shift* y los ensayos de estabilidad en plasma evidenciaron que las variantes fusionadas a GMOP o mGMOP mostraron incrementos significativos en su estabilidad conformacional con respecto a las moléculas no modificadas. Las variantes de rhIFN alcanzaron valores de T_m de 60–62 °C frente a los 57 °C del IFN-wt; mientras que las variantes de rhEPO mostraron incrementos de T_m de aproximadamente 6 °C con respecto a la rhEPO (50 °C). Del mismo modo, la resistencia a la degradación proteolítica aumentó considerablemente, conservando el 50% de la ABE durante períodos entre 3 y 4 veces más prolongados en comparación con el IFN-wt, que perdió el 50% de su actividad a las 39 h, y con la rhEPO, que perdió más de la mitad de su actividad antes de las 24 h. Estos resultados sugieren que los O-glicanos añadidos contribuyen a proteger regiones susceptibles de clivaje y a estabilizar la estructura global de la proteína, en concordancia con el efecto protector ampliamente descrito para la glicosilación en proteínas terapéuticas.

La incorporación de múltiples copias de las etiquetas, sin embargo, implicó un compromiso a nivel de la actividad biológica. La AAV y la AAP disminuyeron en ambas variantes con respecto al IFN-wt, siendo esta reducción más pronunciada para mGMOP₃-IFN-mGMOP en la AAV (reteniendo un 10% frente al 30% de GMOP₃-IFN-GMOP), mientras que en la AAP ambas variantes conservaron aproximadamente un 4% de actividad, sin diferencias significativas entre ellas. La mayor disminución de la AAP era esperada dado el impedimento estérico generado por los O-glicanos adicionales, que dificultan la interacción con el receptor, la cual requiere una mayor afinidad de unión que la involucrada en la AAV. No obstante, no se evidenció un efecto diferencial entre las variantes, lo que podría explicarse por la existencia de un umbral funcional impuesto por la hiperglicosilación, a partir del cual la incorporación de glicanos adicionales no genera un efecto inhibitorio superior detectable. De manera concordante, las variantes de rhEPO también mostraron una disminución de la ABE *in vitro*, probablemente asociada a las modificaciones estructurales y estéricas inducidas por los O-glicanos, sin presentar diferencias significativas entre ellas. Este comportamiento ha sido reportado en otras estrategias de hiperglicosilación, en las que el aumento del contenido de glicanos conduce a una disminución moderada de la actividad específica *in vitro*, acompañada de una mejora sustancial de sus propiedades farmacocinéticas.

El análisis farmacocinético confirmó que la glicosilación adicional conferida por las etiquetas GMOP y mGMOP mejoró sustancialmente los parámetros de exposición sistémica del hIFN. Ambas variantes presentaron una disminución significativa del Cl_{app} (calculado a partir del AUC) y una prolongación del $t_{1/2elim}$ con respecto al IFN-wt, siendo estos efectos más acentuados para mGMOP₃-IFN-mGMOP. La reducción de hasta 7 veces del Cl_{app} y la extensión del tiempo de eliminación hasta 12 h, en comparación con las 0,9 h del IFN-wt,

proporcionan claras evidencias del impacto del mayor grado de O-glicosilación y sialilación sobre los mecanismos de depuración plasmática. Para el caso de las variantes de rhEPO, la farmacocinética también se vio notablemente beneficiada. GMOP₃-EPO-GMOP y mGMOP₃-EPO-mGMOP presentaron incrementos de 2,6 y 3,4 veces en el $t_{1/2elim}$, junto con disminuciones de 2,5 y 4 veces en el Cl_{app} , respectivamente, observándose diferencias significativas entre ambas variantes, lo que confirma que mGMOP aporta un efecto superior tanto en la reducción del *clearance* como en la extensión de la vida media en circulación.

La evaluación *in vivo* de la actividad biológica, mediante la determinación del efecto antitumoral, corroboró que ambas variantes de rhIFN mantienen su eficacia terapéutica, sin diferencias significativas en el peso o volumen tumoral final. Sin embargo, se observó una tendencia a una menor velocidad de crecimiento de los tumores tratados con mGMOP₃-IFN-mGMOP, lo que podría asociarse a su mayor vida media plasmática y a una exposición sistémica más sostenida de la molécula activa. Para el caso de las variantes de rhEPO se observó un comportamiento similar. Aunque la potencia biológica *in vivo* fue marcadamente superior con relación a la rhEPO empleada como estándar, no se detectaron diferencias relevantes entre las variantes fusionadas a los distintos péptidos. En conjunto, estos hallazgos sugieren que la relación entre farmacocinética y potencia biológica debe evaluarse de manera integrada, dado que la prolongación de la vida media puede compensar, al menos parcialmente, la disminución de la afinidad por el receptor. Ensayos adicionales con esquemas de dosis y frecuencias ajustados según los parámetros farmacocinéticos permitirán confirmar si las diferencias estructurales entre ambas etiquetas se traducen en ventajas terapéuticas significativas a largo plazo. Asimismo, estos estudios permitirán determinar si, una vez alcanzado un determinado umbral de glicosilación, el impacto sobre la interacción con el receptor se estabiliza y los beneficios adicionales se reflejan principalmente en la farmacocinética.

La integración de los resultados obtenidos para ambas proteínas permite concluir que las etiquetas GMOP y mGMOP constituyen herramientas de glicoingeniería altamente versátiles y efectivas para mejorar las propiedades de proteínas recombinantes. Ambas confieren estabilidad térmica y resistencia a proteólisis, reducen la tasa de depuración y prolongan la vida media plasmática sin alterar significativamente la estructura ni la funcionalidad general de las proteínas. No obstante, en un contexto de hiper-Oglicosilación, la etiqueta mGMOP se destaca por ofrecer ventajas farmacocinéticas más marcadas, atribuibles su mayor número de sitios de O-glicosilación, que incrementan la sialilación y reducen de manera más eficiente el *clearance* plasmático. Si bien esta mejora no se traduce en una diferencia sustancial en la actividad biológica *in vivo*, el perfil farmacocinético superior demostrado por mGMOP, aún en presencia de una composición heterogénea de isoformas de diferente carga, la posiciona como la opción más prometedora para mejorar la potencia de proteínas terapéuticas. En este

sentido, trabajar en la mejora del contenido de isoformas más acídicas mediante procesos cromatográficos adicionales podría aportar gran relevancia a la etiqueta mGMOP en la búsqueda de sustentar un producto novedoso y a la vez competitivo en el mercado de los biofarmacéuticos.

Finalmente, los resultados confirman la doble funcionalidad de estas etiquetas, que no solo actúan como módulos de glicosilación capaces de modificar favorablemente las propiedades biológicas de las proteínas, sino que también confieren una utilidad analítica sustancial a través del sistema etiqueta–mAb CC1H7, aplicable a procesos de purificación, cuantificación y detección. Esta combinación de atributos convierte a GMOP y mGMOP en plataformas multifuncionales y promisorias para el desarrollo de bioterapéuticos de nueva generación, donde la glicoingeniería racional y la versatilidad analítica convergen en la optimización de procesos productivos de proteínas recombinantes y en la mejora de sus propiedades biológicas.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Adamíková, J., Antošová, M., & Polakovič, M. (2019). Chromatographic purification of recombinant human erythropoietin. *Biotechnology Letters*, 41(4-5), 483-493. <https://doi.org/10.1007/s10529-019-02656-8>
- Adolf, G. R., Kalsner, I., Ahorn, H., Maurer-Fogy, I., & Cantell, K. (1991). Natural human interferon- α 2 is O-glycosylated. *Biochemical Journal*, 276(2). <https://doi.org/10.1042/bj2760511>
- Aghamohseni, H., Ohadi, K., Spearman, M., Krahn, N., Moo-Young, M., Scharer, J. M., Butler, M., & Budman, H. M. (2014). Effects of nutrient levels and average culture pH on the glycosylation pattern of camelid-humanized monoclonal antibody. *Journal of Biotechnology*, 186, 98-109. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.05.024>
- Albrecht, S., Hilliard, M., & Rudd, P. (2014). Therapeutic proteins: facing the challenges of glycobiology. *Journal of Health Policy & Outcomes Research*, 1(5.2), 12-31. <https://doi.org/10.7365/jhpor.2014.5.2>
- Alshamsi, I. (2022). Extended Literature Review of the role of erythropoietin stimulating agents (ESA) use in the management of post renal transplant anaemia. *Transplantation Reports*, 7(2). <https://doi.org/10.1016/j.tpr.2022.100097>
- Amadeo, I., Oggero, M., Zenclussen, M. L., Robles, L., Pereira, D., Kratje, R., & Etcheverrigaray, M. (2004). A single monoclonal antibody as probe to detect the entire set of native and partially unfolded rhEPO glycoforms. *Journal of Immunological Methods*, 293(1-2), 191-205. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.08.003>
- Arakawa, T., Philo, J. S., & Kita, Y. (2001). Kinetic and thermodynamic analysis of thermal unfolding of recombinant erythropoietin. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 65(6), 1321-1327. <https://doi.org/10.1271/bbb.65.1321>
- Arakawa, T., Prestrelski, S. J., Kenney, W. C., & Carpenter, J. F. (2001). Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. En *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 46). www.elsevier.com/locate/drugdeliv
- Arosio, P., Jaquet, B., Wu, H., & Morbidelli, M. (2012). On the role of salt type and concentration on the stability behavior of a monoclonal antibody solution. *Biophysical Chemistry*, 168-169, 19-27. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2012.05.004>
- Ataergin, S., Arpacı, F., Turan, M., Solchaga, L., Cetin, T., Ozturk, M., Ozet, A., Komurcu, S., & Ozturk, B. (2008). Reduced dose of lenograstim is as efficacious as standard dose of filgrastim for peripheral blood stem cell mobilization and transplantation: A randomized study in patients undergoing autologous peripheral stem cell transplantation. *American Journal of Hematology*, 83(8), 644-648. <https://doi.org/10.1002/ajh.21206>

- Aung, T., Grubbe, W. S., Nusbaum, R. J., & Mendoza, J. L. (2023). Recent and future perspectives on engineering interferons and other cytokines as therapeutics. En *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 48, Número 3, pp. 259-273). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2022.09.005>
- Baltimore, D. (1974). The strategy of RNA viruses. En *Harvey lectures* (Vol. 70).
- Bekisz, J., Baron, S., Balinsky, C., Morrow, A., & Zoon, K. C. (2010). Antiproliferative properties of type I and type II interferon. En *Pharmaceuticals* (Vol. 3, Número 4, pp. 994-1015). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ph3040994>
- Belardelli, F., Ferrantini, M., Proietti, E., & Kirkwood, J. M. (2002). Interferon-alpha in tumor immunity and immunotherapy. En *Cytokine & Growth Factor Reviews* (Vol. 13). 10.1016/s1359-6101(01)00022-3
- Bello, C., Rovero, P., & Papini, A. M. (2019). Just a spoonful of sugar: Short glycans affect protein properties and functions. En *Journal of Peptide Science* (Vol. 25, Número 5). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/psc.3167>
- Bennett, E. P., Mandel, U., Clausen, H., Gerken, T. A., Fritz, T. A., & Tabak, L. A. (2012). Control of mucin-type O-glycosylation: A classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. En *Glycobiology* (Vol. 22, Número 6, pp. 736-756). <https://doi.org/10.1093/glycob/cwr182>
- Berger, M., Kaup, M., & Blanchard, V. (2012). Protein glycosylation and its impact on biotechnology. En *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (Vol. 127). https://doi.org/10.1007/10_2011_101
- Bhayani, J. A., & Ballicora, M. A. (2022). Determination of dissociation constants of protein ligands by thermal shift assay. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 590, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.12.041>
- Bimboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513-1523. <https://doi.org/10.1093/NAR/7.6.1513>
- Brizzard, B. (2008). Epitope tagging. *BioTechniques*, 44(5), 693-695. <https://doi.org/10.2144/000112841>
- Buchynskiy, M., Kamyshna, I., Lyubomirskaya, K., Moshynets, O., Kobylak, N., Oksenysh, V., & Kamyshnyi, A. (2023). Efficacy of interferon alpha for the treatment of hospitalized patients with COVID-19: A meta-analysis. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1069894>
- Bürgi, M., Aparicio, G. I., Dorella, A., Kratje, R., Scorticati, C., & Oggero, M. (2021). Novel erythropoietin-based therapeutic candidates with extra N-glycan sites that block hematopoiesis but preserve neuroplasticity. *Biotechnology Journal*, 16(5). <https://doi.org/10.1002/biot.202000455>

- Byrne, B., Donohoe, G. G., & O'Kennedy, R. (2007). Sialic acids: carbohydrate moieties that influence the biological and physical properties of biopharmaceutical proteins and living cells. *Drug Discovery Today*, 12(7-8), 319-326. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2007.02.010>
- Camperi, S. A., Iannucci, N. B., Albanesi, G. J., Oggero Eberhardt, M., Etcheverrigaray, M., Messeguer, A., Albericio, F., & Cascone, O. (2003). Monoclonal antibody purification by affinity chromatography with ligands derived from the screening of peptide combinatorial libraries. *Biotechnology Letters*, 25(18), 1545-1548. <https://doi.org/10.1023/A:1025464918453>
- Carbone, C., & Maschi, F. (2006). El ratón nude (nu/nu) como modelo animal de inmunodeficiencia. *Química Viva*. www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar
- Caron, A. L., Biaggio, R. T., & Swiech, K. (2018). Strategies to suspension serum-free adaptation of mammalian cell lines for recombinant glycoprotein production. En *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1674, pp. 75-85). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7312-5_6
- Carré, A., Samassa, F., Zhou, Z., Perez-Hernandez, J., Lekka, C., Manganaro, A., Oshima, M., Liao, H., Parker, R., Nicastri, A., Brandao, B., Colli, M. L., Eizirik, D. L., Aluri, J., Patel, D., Göransson, M., Burgos Morales, O., Anderson, A., Landry, L., ... Mallone, R. (2025). Interferon- α promotes HLA-B-restricted presentation of conventional and alternative antigens in human pancreatic β -cells. *Nature Communications*, 16(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-025-55908-9>
- Casalis, P., Etcheverrygaray, M., & Oggero, M. (2004). *Obtención y Caracterización de un panel de anticuerpos monoclonales anti-interferon alfa 2b humano recombinante (rhIFN-alfa-20b)* [Tesina para optar por el título de Licenciatura en Biotecnología]. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas - Universidad Nacional del Litoral.
- Castillo, C., Zaror, S., Gonzalez, M., Hidalgo, A., Burgos, C. F., Cabezas, O. I., Hugues, F., Jiménez, S. P., González-Horta, E., González-Chavarría, I., Gavilán, J., Montesino, R., Sánchez, O., Lopez, M. G., Fuentealba, J., & Toledo, J. R. (2018). Neuroprotective effect of a new variant of Epo nonhematopoietic against oxidative stress. *Redox Biology*, 14, 285-294. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.09.010>
- Castro, L. S., Lobo, G. S., Pereira, P., Freire, M. G., Neves, M. C., & Pedro, A. Q. (2021). Interferon-based biopharmaceuticals: Overview on the production, purification, and formulation. *Vaccines*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/vaccines9040328>
- Ceaglio, N., Etcheverrigaray, M., Conradt, H. S., Grammel, N., Kratje, R., & Oggero, M. (2010). Highly glycosylated human alpha interferon: An insight into a new therapeutic candidate. *Journal of Biotechnology*, 146(1-2), 74-83. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.12.020>

- Ceaglio, N., Etcheverrigaray, M., Kratje, R., & Oggero, M. (2008). Novel long-lasting interferon alpha derivatives designed by glycoengineering. *Biochimie*, 90(3), 437-449. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.10.013>
- Ceaglio, N., Gugliotta, A., Tardivo, M. B., Cravero, D., Etcheverrigaray, M., Kratje, R., & Oggero, M. (2016). Improvement of in vitro stability and pharmacokinetics of hIFN- α by fusing the carboxyl-terminal peptide of hCG β -subunit. *Journal of Biotechnology*, 221, 13-24. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.01.018>
- Chen, W., Wen, Z., Zhang, J., Li, C., Huang, K., & Bu, Z. (2018). Establishing a safe, rapid, convenient and low-cost antiviral assay of interferon bioactivity based on recombinant VSV expressing GFP. *Journal of Virological Methods*, 252, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.08.007>
- Chia, S., Tay, S. J., Song, Z., Yang, Y., Walsh, I., & Pang, K. T. (2023). Enhancing pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of recombinant therapeutic proteins by manipulation of sialic acid content. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 163. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114757>
- Choi, H., Kim, T. L., Cho, M. H., & Bhoo, S. H. (2017). Immuno-affinity purification of 2B8-tagged proteins. *Applied Biological Chemistry*, 60(5). <https://doi.org/10.1007/s13765-017-0310-z>
- Conner, K. P., Devanaboyina, S. C., Thomas, V. A., & Rock, D. A. (2020). The biodistribution of therapeutic proteins: Mechanism, implications for pharmacokinetics, and methods of evaluation. En *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 212). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107574>
- Cook, J. A., & Mitchell, J. B. (1989). Viability measurements in mammalian cell systems. *Analytical Biochemistry*, 179(1). [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90191-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90191-7)
- Costa, A. R., Rodrigues, M. E., Henriques, M., Oliveira, R., & Azeredo, J. (2014). Glycosylation: Impact, control and improvement during therapeutic protein production. En *Critical Reviews in Biotechnology* (Vol. 34, Número 4). Informa Healthcare. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.793649>
- Cuatrecasas, P., Wilchek, M., & Anfinsen, C. B. (1968). Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 61(2). <https://doi.org/10.1073/pnas.61.2.636>
- Dalmora, S. L., Ramos, A. S., Schmidt, C. A., Andrade, S. S., Fronza, M., & Rafferty, B. (2003). Biological evaluation of recombinant human erythropoietin in pharmaceutical products. *Biological evaluation of erythropoietin Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36(11), 1561-1569.

- Dammen-Brower, K., Epler, P., Zhu, S., Bernstein, Z. J., Stabach, P. R., Braddock, D. T., Spangler, J. B., & Yarema, K. J. (2022). Strategies for Glycoengineering Therapeutic Proteins. *Frontiers in Chemistry*, 10. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.863118>
- Danzer, K., & Curriet, L. A. (1998). Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part 1. Fundamentals and single component calibration. En *Pure & Appl. Chem* (Vol. 70, Número 4).
- Darula, Z., & Medzihradzsky, K. F. (2018). Analysis of mammalian O-glycopeptides - We have made a good start, but there is a long way to go. *Molecular and Cellular Proteomics*, 17(1), 2-17. <https://doi.org/10.1074/mcp.MR117.000126>
- de Weerd, N. A., Kurowska, A. K., Mendoza, J. L., & Schreiber, G. (2024). Structure–function of type I and III interferons. *Current Opinion in Immunology*, 86. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2024.102413>
- Debeljak, N., & Sytkowski, A. J. (2012). Erythropoietin and erythropoiesis stimulating agents. *Drug Testing and Analysis*, 4(11), 805-812. <https://doi.org/10.1002/dta.1341>
- Decaprio, J., & Kohl, T. O. (2019). Tandem immunoaffinity purification using anti-FLAG and anti-HA antibodies. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(2), 147-153. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot098657>
- Deechongkit, S., Aoki, K. H., Park, S. S., & Kerwin, B. A. (2006). Biophysical comparability of the same protein from different manufacturers: A case study using Epoetin alfa from Epogen® and Eprex®. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 95(9), 1931-1943. <https://doi.org/10.1002/jps.20649>
- Depetris, M.; O. M.; E. , M. (2008). *Obtención de anticuerpos recombinantes anti-IFN-alfa2b destinados a uso terapéutico humano* [Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias Biológicas]. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas - Universidad Nacional del Litoral.
- Dicker, M., & Strasser, R. (2015). Using glyco-engineering to produce therapeutic proteins. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 15(10), 1501-1516. <https://doi.org/10.1517/14712598.2015.1069271>
- Dimitrov, D. S. (2012). Therapeutic proteins. *Methods in Molecular Biology*, 899, 1-26. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-921-1_1
- Dimitrov, J. D., Roumenina, L. T., Andre, S., Repesse, Y., Atanasov, B. P., Jacquemin, M., Saint-Remy, J. M., Bayry, J., Kaveri, S. V., & Lacroix-Desmazes, S. (2009). Kinetics and thermodynamics of interaction of coagulation factor VIII with a pathogenic human antibody. *Molecular Immunology*, 47(2-3). <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.09.021>
- Dissing-Olesen, L., Thaysen-Andersen, M., Meldgaard, M., Højrup, P., & Finsen, B. (2008). The function of the human interferon-β1a glycan determined in vivo. *Journal of*

- Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 326(1), 338-347.
<https://doi.org/10.1124/jpet.108.138263>
- Dolin, R. (2014). *Miscellaneous Antiviral Agents (Interferons, Imiquimod, Pleconaril) interferon classification* (9°, pp. 576-580). Elsevier.
- Dorella, A., Oggero, M., & Bürgi, M. (2017). *Evaluación de distintas variantes de una citoquina que afectan su proceso de producción, purificación y/o caracterización fisicoquímica y biológica* [Tesina para optar por el título de Licenciatura en Biotecnología]. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas - Universidad Nacional del Litoral.
- Du, T., Buenbrazo, N., Kell, L., Rahmani, S., Sim, L., Withers, S. G., DeFrees, S., & Wakarchuk, W. (2019). A Bacterial Expression Platform for Production of Therapeutic Proteins Containing Human-like O-Linked Glycans. *Cell Chemical Biology*, 26(2), 203-212.
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.10.017>
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D., & Naldini, L. (1998). A Third-Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System Downloaded from. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 72(11), 8463-8471. <http://jvi.asm.org/>
- Ebrahimi, S. B., & Samanta, D. (2023). Engineering protein-based therapeutics through structural and chemical design. *Nature Communications*, 14(1).
<https://doi.org/10.1038/s41467-023-38039-x>
- Egrie, J. C., & Browne, J. K. (2001). Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *British Journal of Cancer*, 84(SUPPL. 1).
<https://doi.org/10.1054/bjoc.2001.1746>
- Egrie, J. C., Dwyer, E., Browne, J. K., Hitz, A., & Lykos, M. A. (2003). Darbepoetin alfa has a longer circulating half-life and greater in vivo potency than recombinant human erythropoietin. *Experimental Hematology*, 31(4), 290-299. [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(03\)00006-7](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(03)00006-7)
- El-Baky, N. A., & Redwan, E. M. (2015). Therapeutic alpha-interferons protein: Structure, production, and biosimilar. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 45(2), 109-127.
<https://doi.org/10.1080/10826068.2014.907175>
- Elliott, S., Lorenzini, T., Asher, S., Aoki, K., Brankow, D., Buck, L., Busse, L., Chang, D., Fuller, J., Grant, J., Hernday, N., Hokum, M., Hu, S., Knudten, A., Levin, N., Komorowski, R., Martin, F., Navarro, R., Osslund, T., ... Egrie, J. (2003). Enhancement of therapeutic protein in vivo activities through glycoengineering. *Nature Biotechnology*, 21(4), 414-421.
<https://doi.org/10.1038/nbt799>
- Enomoto, H., Tao, L., Eguchi, R., Sato, A., Honda, M., Kaneko, S., Iwata, Y., Nishikawa, H., Imanishi, H., Iijima, H., Tsujimura, T., & Nishiguchi, S. (2017). The in vivo antitumor effects of type I-interferon against hepatocellular carcinoma: The suppression of tumor cell growth and angiogenesis. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12414-3>

- Esposito, D., & Craigie, R. (1999). HIV integrase structure and function. *Advances in virus research*, 52. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(08\)60304-8](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(08)60304-8)
- European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM). (2025). *European Pharmacopoeia* (12th ed.). Council of Europe. <https://go.edqm.eu/PhEurOnline>
- Familletti, P. C., Rubinstein, S., & Pestka, S. (1981). A Convenient and Rapid Cytopathic Effect Inhibition Assay for Interferon. *Methods in Enzymology*, 78(C). [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(81\)78146-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(81)78146-1)
- Fan, Y., Jimenez Del Val, I., Müller, C., Wagtberg Sen, J., Rasmussen, S. K., Kontoravdi, C., Weilguny, D., & Andersen, M. R. (2015). Amino acid and glucose metabolism in fed-batch CHO cell culture affects antibody production and glycosylation. *Biotechnology and Bioengineering*, 112(3), 521-535. <https://doi.org/10.1002/bit.25450>
- Fares, F., & Azzam, N. (2019). Development of long-acting recombinant glycoprotein hormones by increasing the carbohydrate content. En *Drug Discovery Today* (Vol. 24, Número 4, pp. 1017-1022). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.01.017>
- Fares, F., Ganem, S., Hajouj, T., & Agai, E. (2007). Development of a long-acting erythropoietin by fusing the carboxyl-terminal peptide of human chorionic gonadotropin β -subunit to the coding sequence of human erythropoietin. *Endocrinology*, 148(10). <https://doi.org/10.1210/en.2007-0026>
- Fares, F., Guy, R., Bar-Ilan, A., Felikman, Y., & Fima, E. (2010). Designing a long-acting human growth hormone (hGH) by fusing the carboxyl-terminal peptide of human chorionic gonadotropin β -subunit to the coding sequence of hGH. *Endocrinology*, 151(9). <https://doi.org/10.1210/en.2009-1431>
- Fares, F., Havron, A., & Fima, E. (2011). Designing a long acting erythropoietin by fusing three carboxyl-terminal peptides of human chorionic gonadotropin subunit to the N -terminal and C -terminal coding sequence. *International Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1155/2011/275063>
- Fitzgerald, J., Leonard, P., Darcy, E., Sharma, S., & O'Kennedy, R. (2017). Immunoaffinity chromatography: Concepts and applications. En *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1485, pp. 27-51). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6412-3_3
- Forde, N., & Lonergan, P. (2017). Interferon-tau and fertility in ruminants. *Reproduction*, 154(5), F33-F43. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0432>
- Frame, K. K., & Hut, W.-S. (1990). *The Loss of Antibody Productivity in Continuous Culture of Hybridoma Cells*. 35, 469-476. <https://doi.org/10.1002/bit.260350504>
- Freitas, A. I., Domingues, L., & Aguiar, T. Q. (2022). Tag-mediated single-step purification and immobilization of recombinant proteins toward protein-engineered advanced materials. *Journal of Advanced Research*, 36, 249-264. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.06.010>
- Freshney, R. I. (2014). Animal Cell Culture Guide. En *Atcc* (Vol. 39, Número 6).

- Friguet, B., Chaffotte, A. F., Djavadi-Ohanian, L., & Goldberg, M. E. (1985). Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Immunological Methods*, 77(2). [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(85\)90044-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(85)90044-4)
- Fujii, Y., Kaneko, M. K., & Kato, Y. (2016). MAP Tag: A Novel Tagging System for Protein Purification and Detection. *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy*, 35(6). <https://doi.org/10.1089/mab.2016.0039>
- Fuller S. A., Takahashi M., & Hurrell J. G. R. (1988). Freezing and Recovery of Hybridoma Cell Lines BASIC PROTOCOL. En *Current Protocols in Molecular Biology*.
- Furuhashi, M., Shikone, T., Fares, F. A., Sugahara, T., Hsueh, A. J. W., & Boime, I. (1995). Fusing the carboxy-terminal peptide of the chorionic gonadotropin (CG) β -subunit to the common α -subunit: Retention of O-linked glycosylation and enhanced in vivo bioactivity of chimeric human CG. *Molecular Endocrinology*, 9(1). <https://doi.org/10.1210/mend.9.1.7539107>
- Garfin, D. E. (1990). One-Dimensional Gel Electrophoresis. *Methods in Enzymology*, 182, 425-441. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)82035-Z](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)82035-Z)
- Geisler, C., Mabashi-Asazuma, H., & Jarvis, D. L. (2015). An overview and history of glyco-engineering in insect expression systems. En *Glyco-Engineering: Methods and Protocols* (pp. 131-152). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2760-9_10
- Geraerts, M., Willems, S., Baekelandt, V., Debyser, Z., & Gijsbers, R. (2006). Comparison of lentiviral vector titration methods. *BMC Biotechnology*, 6. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-6-34>
- Ghaderi, D., Taylor, R. E., Padler-Karavani, V., Diaz, S., & Varki, A. (2010). Implications of the presence of N-glycolylneuraminic acid in recombinant therapeutic glycoproteins. *Nature Biotechnology*, 28(8), 863-867. <https://doi.org/10.1038/nbt.1651>
- Ghasriani, H., Belcourt, P. J. F., Sauv e, S., Hodgson, D. J., Brochu, D., Gilbert, M., & Aubin, Y. (2013). A single N-acetylgalactosamine residue at threonine 106 modifies the dynamics and structure of interferon α 2a around the glycosylation site. *Journal of Biological Chemistry*, 288(1), 247-254. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.413252>
- Ghislain, J., Sussman, G., Goelz, S., Ling, L. E., & Fish, E. N. (1995). Configuration of the interferon- α/β receptor complex determines the context of the biological response. *Journal of Biological Chemistry*, 270(37). <https://doi.org/10.1074/jbc.270.37.21785>
- Giorgetti, S. I., Etcheverrigaray, M., Terry, F., Martin, W., De Groot, A. S., Ceaglio, N., Oggero, M., & Mufarrege, E. F. (2021). Development of highly stable and de-immunized versions of recombinant alpha interferon: Promising candidates for the treatment of chronic and emerging viral diseases. *Clinical Immunology*, 233. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2021.108888>

- Goto, M., Akai, K., Murakami, A., Hashimoto, C., Tsuda, E., Ueda, M., Kawanishi, G., Takahashi, N., Ishimoto, A., Chiba, H., & Sasaki, R. (1988). Production of recombinant human erythropoietin in mammalian cells: Host-cell dependency of the biological activity of the cloned glycoprotein. *Bio/Technology*, *6*(1). <https://doi.org/10.1038/nbt0188-67>
- Götzke, H., Kilisch, M., Martínez-Carranza, M., Sograte-Idrissi, S., Rajavel, A., Schlichthaerle, T., Engels, N., Jungmann, R., Stenmark, P., Opazo, F., & Frey, S. (2019). The ALFA-tag is a highly versatile tool for nanobody-based bioscience applications. *Nature Communications*, *10*(1), 4403. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12301-7>
- Grabarz, F., Lopes, A. P. Y., Barbosa, F. F., Barazzone, G. C., Santos, J. C., Botosso, V. F., Jorge, S. A. C., Nascimento, A. L. T. O., Astray, R. M., & Gonçalves, V. M. (2021). Strategies for the production of soluble interferon-alpha consensus and potential application in arboviruses and sars-cov-2. *Life*, *11*(6). <https://doi.org/10.3390/life11060460>
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *Journal of General Virology*, *36*(1), 59-74. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-36-1-59>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). *Agarose gel electrophoresis*. Cold Spring Harbor Protocols. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot100404>
- Greene, A. E., Athreya, B., Lehr, H. B., & Coriell, L. L. (1967). Viability of Cell Cultures Following Extended Preservation in Liquid Nitrogen. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *124*(6), 1302-1307. <https://doi.org/10.3181/00379727-124-31992>
- Greenfield, E. A. (2019). Preparing feeder cell cultures to support hybridoma growth. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2019*(11), 722-725. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot103168>
- Gregoriadis, G., Fernandes, A., Mital, M., & McCormack, B. (2000). Review polysialic acids: potential in improving the stability and pharmacokinetics of proteins and other therapeutics. *Cellular and Molecular Life Sciences* *57*, 1964–1969. <https://doi.org/10.1007/PL00000676>
- Grossmann, M., Szkudlinski, M. W., Tropea, J. E., Bishop, L. A., Thotakura, N. R., Schofield, P. R., & Weintraub, B. D. (1995). Expression of human thyrotropin in cell lines with different glycosylation patterns combined with mutagenesis of specific glycosylation sites: Characterization of a novel role for the oligosaccharides in the *in vitro* and *in vivo* bioactivity. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(49), 29378-29385. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.49.29378>
- Guan, Y., Zhang, M., Gaikwad, M., Voss, H., Fazel, R., Ansari, S., Shen, H., Wang, J., & Schlüter, H. (2021). An integrated strategy reveals complex glycosylation of erythropoietin using mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*, *20*(7), 3654-3663. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.1c00221>

- Gugliotta, A., Ceaglio, N., Kratje, R., & Oggero, M. (2019). Effect of ANITVNITV peptide fusion on the bioactivity and pharmacokinetics of human IFN- α 2b and a hyper-n-glycosylated variant. *Journal of Biotechnology*, 303(9), 46-52. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.07.006>
- Gugliotta, A., Ceaglio, N., Raud, B., Forno, G., Mauro, L., Kratje, R., & Oggero, M. (2017). Glycosylation and antiproliferative activity of hyperglycosylated IFN- α 2 potentiate HEK293 cells as biofactories. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 112(Suppl. C), 119-131. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.11.012>
- Gugliotta, A., Leopold, M. J., Mufarrege, E., Etcheverrigaray, M., Kratje, R., Ceaglio, N., & Oggero, M. (2021). Pharmacokinetics versus *in vitro* antiproliferative potency to design a novel hyperglycosylated hIFN- α 2 biobetter. *Pharmaceutical Research*, 38(1), 37-50. <https://doi.org/10.1007/s11095-020-02978-7>
- Gugliotta, A., Oggero-Eberhardt, M., Etcheverrigaray, M., Kratje, R., & Ceaglio, N. (2013). Differences in the production of hyperglycosylated IFN alpha in CHO and HEK 293 cells. *BMC Proceedings*, 7(S6), 33. <https://doi.org/10.1186/1753-6561-7-s6-p33>
- Gull, I., Samra, Z. Q., Aslam, M. S., & Amin Athar, M. (2013). Heterologous expression, immunochemical and computational analysis of recombinant human interferon alpha 2b. *SpringerPlus*, 2, 264. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-264>
- Gupta, S. K., & Shukla, P. (2018). Glycosylation control technologies for recombinant therapeutic proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(24), 10457-10468. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9430-6>
- Gustafsson, B. (1990). Cryopreservation of hybridomas. In J. M. Walker & J. W. Pollard (Eds.), *Animal cell culture. Methods in Molecular Biology*, (pp. 619-621). Humana Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1385/0-89603-150-0:619>
- Hackemann, E., & Hasse, H. (2017). Influence of mixed electrolytes and pH on adsorption of bovine serum albumin in hydrophobic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1521, 73-79. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.09.024>
- Hage, D. S. (1998). Survey of recent advances in analytical applications of immunoaffinity chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 715(1), 3-28. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(97\)00621-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(97)00621-X)
- Halawa, M. (2019). Novel fusion tags for protein production, purification and research applications (*Thesis for Doctorate, University of Nottingham*). School of Pharmacy.
- Harding, C. M., & Feldman, M. F. (2019). Glycoengineering bioconjugate vaccines, therapeutics, and diagnostics in *E. coli*. En *Glycobiology* (Vol. 29, Número 7, pp. 519-529). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwz031>
- Harlow, E., & Lane, D. (1988). *Antibodies. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. [https://doi.org/10.1016/0307-4412\(89\)90165-9](https://doi.org/10.1016/0307-4412(89)90165-9)

- Häußler, D., Manevski, D., Frädrich, J., Brunner, V., Prokopchuk, O., Sommer, A., Toledo, B., Knolle, P., Martignoni, M. E., Friess, H., Waterhouse, P., & Krüger, A. (2025). Extent of N-glycosylation of the metalloproteinase inhibitor and cytokine TIMP-1 determines pancreatic cancer cell proliferation and survival via CD63. *Journal of Biological Chemistry*, 301(6). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2025.110211>
- He, M., Zhou, X., & Wang, X. (2024). Glycosylation: mechanisms, biological functions and clinical implications. En *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 9, Número 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01886-1>
- Hemani, S., Lane, O., Agarwal, S., Yu, S. P., & Woodbury, A. (2021). Systematic Review of Erythropoietin (EPO) for Neuroprotection in Human Studies. En *Neurochemical Research* (Vol. 46, Número 4, pp. 732-739). Springer. <https://doi.org/10.1007/s11064-021-03242-z>
- Hessefort, H., Gross, A., Seeleithner, S., Hessefort, M., Kirsch, T., Perkams, L., Bundgaard, K. O., Gottwald, K., Rau, D., Graf, C. G. F., Rozanski, E., Weidler, S., & Unverzagt, C. (2021). Chemical and Enzymatic Synthesis of Sialylated Glycoforms of Human Erythropoietin. *Angewandte Chemie - International Edition*, 60(49), 25922-25932. <https://doi.org/10.1002/anie.202110013>
- Hoffmanns, L., Svedberg, D., & Mateus, A. (2025). Protein O-glycosylation in the Bacteroidota phylum. En *FEBS Open Bio*. John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.70041>
- Ibbotson, T., & Goa, K. L. (2001). Darbepoetin Alfa. *Drugs*, 61, 2097-2104. <https://doi.org/10.2165/00003495-200161140-00007>
- ICH Harmonised Guideline. (2022). *Bioanalytical method validation and study sample analysis M10*.
- Indraccolo, S. (2010). Interferon- α as angiogenesis inhibitor: Learning from tumor models. *Autoimmunity*, 43(3), 244-247. <https://doi.org/10.3109/08916930903510963>
- Iturraspe, F., Gugliotta, A., & Ceaglio, N. (2019). *Glicoingeniería de hIFN- α 2b: Producción de variantes terapéuticas altamente O-glicosiladas empleando un nuevo péptido derivado del GM-CSF humano*.
- Ivarsson, M., Villiger, T. K., Morbidelli, M., & Soos, M. (2014). Evaluating the impact of cell culture process parameters on monoclonal antibody N-glycosylation. *Journal of Biotechnology*, 188, 88-96. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.08.026>
- Jaitin, D. A., Roisman, L. C., 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- α 2 Mutant with Enhanced Affinity to IFNAR1 Is Functionally Similar to IFN- β . *Molecular and Cellular Biology*, 26(5). <https://doi.org/10.1128/mcb.26.5.1888-1897.2006>

- Jaks, E., Gavutis, M., Uzé, G., Martal, J., & Piehler, J. (2007). Differential Receptor Subunit Affinities of Type I Interferons Govern Differential Signal Activation. *Journal of Molecular Biology*, 366(2). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.11.053>
- Jelkmann, W. (2002). The enigma of the metabolic fate of circulating erythropoietin (Epo) in view of the pharmacokinetics of the recombinant drugs rhEpo and NESP. En *European Journal of Haematology* (Vol. 69, Números 5-6, pp. 265-274). <https://doi.org/10.1034/j.1600-0609.2002.02813.x>
- Jenkins, N., & Curling, E. M. A. (1994). Glycosylation of recombinant proteins: Problems and prospects. En *Enzyme and Microbial Technology* (Vol. 16, Número 5). [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90149-X](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90149-X)
- Jensen, P. H., Kolarich, D., & Packer, N. H. (2010). Mucin-type O-glycosylation - Putting the pieces together. En *FEBS Journal* (Vol. 277, Número 1, pp. 81-94). <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07429.x>
- Jia, H., Guo, Y., Song, X., Shao, C., Wu, J., Ma, J., Shi, M., Miao, Y., Li, R., Wang, D., Tian, Z., & Xiao, W. (2016). Elimination of N-glycosylation by site mutation further prolongs the half-life of IFN- α /Fc fusion proteins expressed in *Pichia pastoris*. *Microbial Cell Factories*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0601-9>
- Johnston, M. J. W., Frahm, G., Li, X., Durocher, Y., & Hefford, M. A. (2011). O-linked glycosylation leads to decreased thermal stability of interferon alpha 2b as measured by two orthogonal techniques. *Pharmaceutical Research*, 28(7), 1661-1667. <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0402-0>
- Julenius, K., Mølgaard, A., Gupta, R., & Brunak, S. (2005). Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites. *Glycobiology*, 15(2). <https://doi.org/10.1093/glycob/cwh151>
- Jungersen, G., & Piedrahita, J. (2018). Introduction: Immune Relevant Animal Models: Opportunities and Challenges. En *ILAR Journal* (Vol. 59, Número 3, pp. 209-210). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilz014>
- Kaighn, M. E., Narayan, K. S., Ohnuki, Y., Lechner, J. F., & Jones, L. W. (1979). Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol.*, 16-23.
- Karakoese, Z., Le-Trilling, V. T. K., Schuhenn, J., Francois, S., Lu, M., Liu, J., Trilling, M., Hoffmann, D., Dittmer, U., & Sutter, K. (2023). Targeted mutations in IFN α 2 improve its antiviral activity against various viruses. *mBio*, 14(6). <https://doi.org/10.1128/mbio.02357-23>
- Katla, S., Yoganand, K. N. R., Hingane, S., Ranjith Kumar, C. T., Anand, B., & Sivaprakasam, S. (2019). Novel glycosylated human interferon alpha 2b expressed in glycoengineered *Pichia pastoris* and its biological activity: N-linked glycoengineering approach. *Enzyme and Microbial Technology*, 128, 49-58. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.05.007>

- Kayser, V., Chennamsetty, N., Voynov, V., Forrer, K., Helk, B., & Trout, B. L. (2011). Glycosylation influences on the aggregation propensity of therapeutic monoclonal antibodies. *Biotechnology Journal*, 6(1), 38-44. <https://doi.org/10.1002/biot.201000091>
- Khodabakhsh, F., Salimian, M., Hedayati, M. H., Ahangari Cohan, R., & Norouzian, D. (2021). Challenges and advancements in the pharmacokinetic enhancement of therapeutic proteins. En *Preparative Biochemistry and Biotechnology* (Vol. 51, Número 6, pp. 519-529). Bellwether Publishing, Ltd. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1839907>
- Kiladjian, J.-J. (2024). Pegylated interferon: the who, why, and how. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 10.1182/hematology.2024000577
- Kitamura, T., Tange, T., Terasawa, T., Chiba, S., Urabe, A., & Takaku, A. R. O. (1989). Establishment and Characterization of a Unique Human Cell Line That Proliferates Dependently on CM-CSF, IL-3, or Erythropoietin. En *JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY* (Vol. 140).
- Klausing, S. (2022). *Adaptation of Mammalian Cell Lines to Serum-Free Suspension Culture*. www.sartorius.com
- Klein, E., Klein, G., Nadkarni, J. S., Nadkarni, J. J., Wigzell, H., & Clifford, P. (1968). Surface IgM-kappa Specificity on a Burkitt Lymphoma Cell In Vivo and in Derived Culture Lines. *Cancer Research*, 28(7).
- Klein, J., Lobel, L., Pollak, S., Ferin, M., Xiao, E., Sauer, M., & Lustbader, J. W. (2002). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of single-chain recombinant human follicle-stimulating hormone containing the human chorionic gonadotropin carboxyterminal peptide in the rhesus monkey. *Fertility and Sterility*, 77(6). [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)03113-8](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)03113-8)
- Komatsu, N., Yamamoto, M., Fujita, H., Miwa, A., Hatake, K., Endo, T., Okano, H., Katsube, T., Fukumaki, Y., Sassa, S., & Miura, Y. (1993). Establishment and Characterization of an Erythropoietin-Dependent Subline, UT-7/Epo, Derived From Human Leukemia Cell Line, UT-7. *Blood*, 82, 456-464. <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/82/2/456/611049/456.pdf>
- Kooi, A. Vander, Wang, S., Fan, M. N., Chen, A., Zhang, J., Chen, C. Y., Cai, X., Konkle, B. A., Xiao, W., Li, L., & Miao, C. H. (2022). Influence of N-glycosylation in the A and C domains on the immunogenicity of factor VIII. *Blood Advances*, 6(14), 4271-4282. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021005758>
- Kumaran, J., Wei, L., Kotra, L. P., & Fish, E. N. (2007). A structural basis for interferon- α receptor interactions. *The FASEB Journal*, 21(12), 3288-3296. <https://doi.org/10.1096/fj.07-8585com>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259). <https://doi.org/10.1038/227680a0>

- Lagassé, H. A. D., Sauna, Z. E., Alexaki, A., Simhadri, V. L., Katagiri, N. H., Jankowski, W., & Kimchi-Sarfaty, C. (2017). Recent advances in (therapeutic protein) drug development. En *F1000Research* (Vol. 6). Faculty of 1000 Ltd. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9970.1>
- Lah, J., Prislán, I., Kržan, B., Salobir, M., Francky, A., & Vesnaver, G. (2005). Erythropoietin unfolding: Thermodynamics and its correlation with structural features. *Biochemistry*, 44(42), 13883-13892. <https://doi.org/10.1021/bi0512952>
- Lai, J. Y., Ho, J. X., Kow, A. S. F., Liang, G., Tham, C. L., Ho, Y. C., & Lee, M. T. (2023). Interferon therapy and its association with depressive disorders – A review. En *Frontiers in Immunology* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1048592>
- Lakens, D. (2013). Calculating and reporting effect sizes to facilitate cumulative science: A practical primer for t-tests and ANOVAs. *Frontiers in Psychology*, 4(NOV). <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2013.00863>
- Lalonde, M. E., & Durocher, Y. (2017). Therapeutic glycoprotein production in mammalian cells. En *Journal of Biotechnology* (Vol. 251, pp. 128-140). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.04.028>
- Lapolt, P. S., Nishimori, K., Fares, F. A., Perlas, E., Boime, I., & Hsueh, A. J. W. (1992). Enhanced stimulation of follicle maturation and ovulatory potential by long acting follicle-stimulating hormone agonists with extended carboxyl-terminal peptides. *Endocrinology*, 131(6). <https://doi.org/10.1210/endo.131.6.1446593>
- Lee, B.-K., Kwon, J.-S., Kim, H.-J., Shuichi, Y., & Lee, E. K. (2007). Solid-phase PEGylation of recombinant interferon α -2a for site-specific modification: Process performance, characterization, and in vitro bioactivity. *Bioconjugate Chemistry*, 18(6), 1728-1734. <https://doi.org/10.1021/bc060245m>
- Lee, G. M., Huard, T. K., & Palsson, B. O. (1989). Effect of Serum Concentration on Hybridoma Cell Growth and Monoclonal Antibody Production at Various Initial Cell Densities. En *HYBRIDOMA* (Vol. 8, Número 3). Mary Ann Liebert, Inc., Publishers.
- Lee, Y. F., Jöhnck, M., & Frech, C. (2018). Evaluation of differences between dual salt-pH gradient elution and mono gradient elution using a thermodynamic model: Simultaneous separation of six monoclonal antibody charge and size variants on preparative-scale ion exchange chromatographic resin. *Biotechnology Progress*, 34(4), 973-986. <https://doi.org/10.1002/btpr.2626>
- Li, H., & d'Anjou, M. (2009). Pharmacological significance of glycosylation in therapeutic proteins. En *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 20, Número 6, pp. 678-684). <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.10.009>
- Li, S. F., Gong, M. J., Zhao, F. R., Shao, J. J., Xie, Y. L., Zhang, Y. G., & Chang, H. Y. (2018). Type I interferons: Distinct biological activities and current applications for viral infection. En

- Cellular Physiology and Biochemistry* (Vol. 51, Número 5, pp. 2377-2396). S. Karger AG. <https://doi.org/10.1159/000495897>
- Li, S., Liu, B., Zeng, R., Cai, Y., & Li, Y. (2006). Predicting O-glycosylation sites in mammalian proteins by using SVMs. *Computational Biology and Chemistry*, 30(3). <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2006.02.002>
- Lin, L., Liu, C., Nayak, B. C., He, W., You, M., & Yuchi, Z. (2018). A two-step purification strategy using calmodulin as an affinity tag. *Journal of Chromatography A*, 1544, 16-22. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.02.045>
- Lin, N., Mascarenhas, J., Sealover, N. R., George, H. J., Brooks, J., Kayser, K. J., Gau, B., Yasa, I., Azadi, P., & Archer-Hartmann, S. (2015). Chinese hamster ovary (CHO) host cell engineering to increase sialylation of recombinant therapeutic proteins by modulating sialyltransferase expression. *Biotechnology Progress*, 31(2), 334-346. <https://doi.org/10.1002/btpr.2038>
- Lin, Q., Choyke, P. L., & Sato, N. (2023). Visualizing vasculature and its response to therapy in the tumor microenvironment. En *Theranostics* (Vol. 13, Número 15, pp. 5223-5246). Ivyspring International Publisher. <https://doi.org/10.7150/thno.84947>
- Lisowska, E., & Jaskiewicz, E. (2012). Protein Glycosylation, an Overview. *Encyclopedia of Life Sciences*. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a006211.pub3>
- Liu, S., Rao, S., Chen, X., & Li, J. (2022). Enhanced salt-tolerance of *Bacillus subtilis* glutaminase by fusing self-assembling amphipathic peptides at its N-terminus. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.996138>
- Llames, S., García-Pérez, E., Meana, Á., Larcher, F., & Del Río, M. (2015). Feeder Layer Cell Actions and Applications. En *Tissue Engineering - Part B: Reviews* (Vol. 21, Número 4, pp. 345-353). Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2014.0547>
- Loaeza-Reyes, K. J., Zenteno, E., Moreno-Rodríguez, A., Torres-Rosas, R., Argueta-Figueroa, L., Salinas-Marín, R., Castillo-Real, L. M., Pina-Canseco, S., & Cervera, Y. P. (2021). An Overview of Glycosylation and its Impact on Cardiovascular Health and Disease. En *Frontiers in Molecular Biosciences* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.751637>
- Loignon, M., Perret, S., Kelly, J., Boulais, D., Cass, B., Bisson, L., Afkhamizarreh, F., & Durocher, Y. (2008). Stable high volumetric production of glycosylated human recombinant IFN α 2b in HEK293 cells. *BMC Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-8-65>
- Lopez-Vince, E., Wilhelm, C., & Simon-Yarza, T. (2024). Vascularized tumor models for the evaluation of drug delivery systems: a paradigm shift. En *Drug Delivery and Translational Research* (Vol. 14, Número 8, pp. 2216-2241). Springer. <https://doi.org/10.1007/s13346-024-01580-3>

- Lottersberger, J., & Prieto, C. (2022). *Adaptación y Optimización de cultivo de células HEK293 Y CHO-K1 a medios libres de suero. Su aplicación en la producción de proteínas de interés biotecnológico en salud animal*. [Tesis para optar por el título de Licenciatura en Biotecnología]. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas - Universidad Nacional del Litoral.
- Lovelock, J. E., & Bishop, M. W. H. (1959). Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature*, 183(4672). <https://doi.org/10.1038/1831394a0>
- Lv, Y., Qi, J., Babon, J. J., Cao, L., Fan, G., Lang, J., Zhang, J., Mi, P., Kobe, B., & Wang, F. (2024). The JAK-STAT pathway: from structural biology to cytokine engineering. En *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 9, Número 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01934-w>
- Ma, B., Guan, X., Li, Y., Shang, S., Li, J., & Tan, Z. (2020). Protein Glycoengineering: An Approach for Improving Protein Properties. En *Frontiers in Chemistry* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00622>
- Ma, Y., Zhou, Z., Yang, G. Y., Ding, J., & Wang, X. (2022). The Effect of Erythropoietin and Its Derivatives on Ischemic Stroke Therapy: A Comprehensive Review. En *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.743926>
- Madin, S. H., & Darby, N. B. (1958). Established Kidney Cell Lines of Normal Adult Bovine and Ovine Origin. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 98(3). <https://doi.org/10.3181/00379727-98-24111>
- Mahmood, I., & Green, M. D. (2005). Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations in the development of therapeutic proteins. En *Clinical Pharmacokinetics* (Vol. 44, Número 4). <https://doi.org/10.2165/00003088-200544040-00001>
- Mahmoudi Gomari, M., Saraygord-Afshari, N., Farsimadan, M., Rostami, N., Aghamiri, S., & Farajollahi, M. M. (2020). Opportunities and challenges of the tag-assisted protein purification techniques: Applications in the pharmaceutical industry. En *Biotechnology Advances* (Vol. 45). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107653>
- Mahran, R., Vello, N., Komulainen, A., Malakoutikhah, M., Härmä, H., & Kopra, K. (2023). Isothermal chemical denaturation assay for monitoring protein stability and inhibitor interactions. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-46720-w>
- Maltieri, R. E. (2018). *Mecanismos de acción de eritropoyetina y eritropoyetina carbamilada en la funcionalidad de células endoteliales* [Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica]. Universidad de Buenos Aires.
- Manna, L., Di Febo, T., Armillotta, G., Luciani, M., Ciarelli, A., Salini, R., & Di Ventura, M. (2015). Production of Monoclonal Antibodies in Serum-free Media. *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy*, 34(4). <https://doi.org/10.1089/mab.2015.0004>

- Manning, M. C., Chou, D. K., Murphy, B. M., Payne, R. W., & Katayama, D. S. (2010). Stability of protein pharmaceuticals: An update. En *Pharmaceutical Research* (Vol. 27, Número 4, pp. 544-575). <https://doi.org/10.1007/s11095-009-0045-6>
- Marigliani, B., Balottin, L. B. L., & Augusto, E. de F. P. (2019). Adaptation of Mammalian Cells to Chemically Defined Media. *Current Protocols in Toxicology*, 82(1). <https://doi.org/10.1002/cptx.88>
- Martin, S. R., & Schilstra, M. J. (2008). Circular Dichroism and Its Application to the Study of Biomolecules. En *Methods in Cell Biology* (Vol. 84, pp. 263-293). [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(07\)84010-6](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(07)84010-6)
- Mastrangeli, R., Audino, M. C., Palinsky, W., Broly, H., & Bierau, H. (2021). Current views on N-glycolylneuraminic acid in therapeutic recombinant proteins. En *Trends in Pharmacological Sciences* (Vol. 42, Número 11, pp. 943-956). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2021.08.004>
- Mattio, M., Ceaglio, N., Oggero, M., Perotti, N., Amadeo, I., Orozco, G., Forno, G., Kratje, R., & Etcheverrigaray, M. (2011). Isolation and characterization of a subset of erythropoietin glycoforms with cytoprotective but minimal erythropoietic activity. *Biotechnology Progress*, 27(4), 1018-1028. <https://doi.org/10.1002/btpr.633>
- Mazuca, L. G., & Mohl, J. E. (2024). ISOGlyP: O-Glycosylation Site Prediction Using Peptide Sequences and GALNTs. En *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2763). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3670-1_20
- McGillicuddy, N., Floris, P., Albrecht, S., & Bones, J. (2018). Examining the sources of variability in cell culture media used for biopharmaceutical production. En *Biotechnology Letters* (Vol. 40, Número 1, pp. 5-21). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s10529-017-2437-8>
- Meager, A. (2002). Biological assays for interferons. En *Journal of Immunological Methods* (Vol. 261, Números 1-2). [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(01\)00570-1](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(01)00570-1)
- Merritt, S. E., & Palsson, B. O. (1993). Loss of Antibody Productivity Is Highly Reproducible in Multiple Hybridoma Subclones. *Biotechnology and Bioengineering*, 42, 247-250. DOI: 10.1002/bit.260420213
- Metta, M. K., Malkhed, V., Tantravahi, S., Vuruputuri, U., & Kunaparaju, R. (2017). Development of an in vitro Bioassay for Recombinant Human Erythropoietin (rHuEPO) Based on Proliferative Stimulation of an Erythroid Cell Line and Analysis of Sialic Acid Dependent Microheterogeneity: UT-7 Cell Bioassay. *Protein Journal*, 36(2), 112-122. <https://doi.org/10.1007/s10930-017-9704-3>
- Mills, B. J., & Laurence Chadwick, J. S. (2018). Effects of localized interactions and surface properties on stability of protein-based therapeutics. En *Journal of Pharmacy and*

- Pharmacology* (Vol. 70, Número 5, pp. 609-624). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jphp.12658>
- Mire-Sluis, A. R. (2001). Progress in the use of biological assays during the development of biotechnology products. En *Pharmaceutical Research* (Vol. 18, Número 9). <https://doi.org/10.1023/A:1013067424248>
- Mire-Sluis, A. R., Page, L., & Thorpe, R. (1995). Quantitative cell line based bioassays for human cytokines. En *Journal of Immunological Methods* (Vol. 187, Número 2). [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(95\)00220-1](https://doi.org/10.1016/0022-1759(95)00220-1)
- Mohl, J. E., Gerken, T., & Leung, M. Y. (2020). Predicting mucin-type O-glycosylation using enhancement value products from derived protein features. *Journal of Theoretical and Computational Chemistry*, 19(3). <https://doi.org/10.1142/S0219633620400039>
- Moreau, T. R. J., Bondet, V., Rodero, M. P., & Duffy, D. (2023). Heterogeneity and functions of the 13 IFN- α subtypes – lucky for some? En *European Journal of Immunology* (Vol. 53, Número 8). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/eji.202250307>
- Moremen, K. W., Tiemeyer, M., & Nairn, A. V. (2012). Vertebrate protein glycosylation: Diversity, synthesis and function. En *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 13, Número 7, pp. 448-462). <https://doi.org/10.1038/nrm3383>
- Moser, A. C., & Hage, D. S. (2010). Immunoaffinity chromatography: An introduction to applications and recent developments. En *Bioanalysis* (Vol. 2, Número 4, pp. 769-790). <https://doi.org/10.4155/bio.10.31>
- Mufarrege, E. F., Giorgetti, S., Etcheverrigaray, M., Terry, F., Martin, W., & De Groot, A. S. (2017). De-immunized and Functional Therapeutic (DeFT) versions of a long lasting recombinant alpha interferon for antiviral therapy. *Clinical Immunology*, 176, 31-41. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2017.01.003>
- Murray, T. V., Kozakowska-McDonnell, K., Tibbles, A., Taylor, A., Higazi, D., Rossy, E., Rossi, A., Genapathy, S., Tamburrino, G., Rath, N., Tigue, N., Lindo, V., Vaughan, T., & Papworth, M. A. (2021). An efficient system for bioconjugation based on a widely applicable engineered O-glycosylation tag: Short title: Controlled bioconjugation via O-glycan engineering. *mAbs*, 13(1). <https://doi.org/10.1080/19420862.2021.1992068>
- Nadkarni, J. S., Nadkarni, J. J., Clifford, P., Manolov, G., Fenyö, E. M., & Klein, E. (1969). Characteristics of new cell lines derived from Burkitt lymphomas. *Cancer*, 23(1). [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(196901\)23:1<64::AID-CNCR2820230107>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1097-0142(196901)23:1<64::AID-CNCR2820230107>3.0.CO;2-M)
- Naldini, L., Blömer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M., & Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 272(5259). <https://doi.org/10.1126/science.272.5259.263>
- Narimatsu, Y., Büll, C., Chen, Y. H., Wandall, H. H., Yang, Z., & Clausen, H. (2021). Genetic glycoengineering in mammalian cells. En *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 296).

- American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100448>
- 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(1). [https://doi.org/10.1016/1045-1056\(90\)90066-9](https://doi.org/10.1016/1045-1056(90)90066-9)
- Ngantung, F. A. (2005). *Engineering Mammalian Cell Line to Improve Sialylation*.
- Nyman, T. A., Kalkkinen, N., Tölö, H., & Helin, J. (1998). Structural characterisation of N-linked and O-linked oligosaccharides derived from interferon- α 2b and interferon- α 14c produced by Sendai-virus- induced human peripheral blood leukocytes. *European Journal of Biochemistry*, 253(2), 485-493. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2530485.x>
- O'Flaherty, R., Amez Martín, M., Gardner, R. A., Jennings, P. M., Rudd, P. M., Spencer, D. I. R., & Falck, D. (2024). Erythropoietin N-glycosylation of Therapeutic Formulations Quantified and Characterized: An Interlab Comparability Study of High-Throughput Methods. *Biomolecules*, 14(1). <https://doi.org/10.3390/biom14010125>
- O'Flaherty, R., Bergin, A., Flampouri, E., Mota, L. M., Obaidi, I., Quigley, A., Xie, Y., & Butler, M. (2020). Mammalian cell culture for production of recombinant proteins: A review of the critical steps in their biomanufacturing. En *Biotechnology Advances* (Vol. 43). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107552>
- Oggero, M., Forno, G., Kratje, R., & Etcheverrigaray, M. (2006). Rational selection of an antibody probe to detect the heterogeneous collection of CHO-derived rhGM-CSF glycoforms. *Biotechnology Letters*, 28(24), 2049-2056. <https://doi.org/10.1007/s10529-006-9187-3>
- Oggero, M., Frank, R., Etcheverrigaray, M., & Kratje, R. (2004). Defining the antigenic structure of human GM-CSF and its implications for receptor interaction and therapeutic treatments. *Molecular Diversity*, 8, 257-269. <https://doi.org/10.1023/b:modi.0000036239.87460.a3>
- Ordoño, D., Enjuanes, L., & Casasnovas, J. M. (2006). Methods for preparation of low abundance glycoproteins from mammalian cell supernatants. *International Journal of Biological Macromolecules*, 39(1-3), 151-156. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2006.05.010>
- Ortega, V., Stone, J. A., Contreras, E. M., Iorio, R. M., & Aguilar, H. C. (2018). Addicted to sugar: roles of glycans in the order Mononegavirales. *Glycobiology*. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwy053/5033617>
- Oswald, D. M., & Cobb, B. A. (2018). Emerging glycobiology tools: A renaissance in accessibility. En *Cellular Immunology* (Vol. 333, pp. 2-8). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.04.010>

- Pang, A. N., Chen, S. N., Liu, L. H., Li, B., Song, J. W., Zhang, S., & Nie, P. (2024). IFN- α and its receptor subunits, IFN- α R1 and IL10RB in mallard *Anas platyrhynchos*. *Poultry Science*, 103(6). <https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.103673>
- Papathanasiou, M. M., & Kontoravdi, C. (2020). Engineering challenges in therapeutic protein product and process design. En *Current Opinion in Chemical Engineering* (Vol. 27, pp. 81-88). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2019.11.010>
- Paul, F., Pellegrini, S., & Uzé, G. (2015). IFNA2: The prototypic human alpha interferon. En *Gene* (Vol. 567, Número 2, pp. 132-137). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.04.087>
- Peleg-Shulman, T., Tsubery, H., Mironchik, M., Fridkin, M., Schreiber, G., & Shechter, Y. (2004). Reversible PEGylation: A novel technology to release native interferon α 2 over a prolonged time period. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(20), 4897-4904. <https://doi.org/10.1021/jm0497693>
- Peng, B., Kong, G., Yang, C., & Ming, Y. (2020). Erythropoietin and its derivatives: from tissue protection to immune regulation. En *Cell Death and Disease* (Vol. 11, Número 2). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2276-8>
- Perlman, S., Van Den Hazel, B., Christiansen, J., Gram-Nielsen, S., Jeppesen, C. B., Andersen, K. V., Halkier, T., Okkels, S., & Schambye, H. T. (2003). Glycosylation of an N-terminal extension prolongs the half-life and increases the in vivo activity of follicle stimulating hormone. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(7), 3227-3235. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-021201>
- Perotti, N., Etcheverrigaray, M., Kratje, R., & Oggero, M. (2013). A versatile ionic strength sensitive tag from a human GM-CSF-derived linear epitope. *Protein Expression and Purification*, 91(1). <https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.06.009>
- Perry, C., & Rayat, A. C. M. E. (2021). Lentiviral vector bioprocessing. *Viruses*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/v13020268>
- Pestka, S. (2007). The interferons: 50 Years after their discovery, there is much more to learn. En *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 282, Número 28, pp. 20047-20051). <https://doi.org/10.1074/jbc.R700004200>
- Petrauskas, V., Kazlauskas, E., Gedgaudas, M., Baranauskienė, L., Zubrienė, A., & Matulis, D. (2024). Thermal shift assay for protein–ligand dissociation constant determination. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 170, 117417. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2023.117417>
- Petris, G., Bestagno, M., Arnoldi, F., & Burrone, O. R. (2014). New tags for recombinant protein detection and O-glycosylation reporters. *PLoS ONE*, 9(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096700>

- Pisal, D. S., Kosloski, M. P., & Balu-Iyer, S. V. (2010). Delivery of therapeutic proteins. En *Journal of Pharmaceutical Sciences* (Vol. 99, Número 6, pp. 2557-2575). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jps.22054>
- Prieto, C., Fontana, D., Etcheverrigaray, M., & Kratje, R. (2011). A strategy to obtain recombinant cell lines with high expression levels. Lentiviral vector-mediated transgenesis. *BMC Proceedings*, 5(S8). <https://doi.org/10.1186/1753-6561-5-s8-p7>
- Puck, T. T., Cieciura, S. J., & Robinson, A. (1958). Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *The Journal of experimental medicine*, 108(6). <https://doi.org/10.1084/jem.108.6.945>
- Qu, J., Ma, C., Xu, X. Q., Xiao, M., Zhang, J., Li, D., Liu, D., Konkle, B. A., Miao, C. H., Li, L., & Xiao, W. (2020). Comparative glycosylation mapping of plasma-derived and recombinant human factor VIII. *PLoS ONE*, 15(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233576>
- Ramos, T. I., Villacis-Aguirre, C. A., Santiago Vispo, N., Santiago Padilla, L., Santana, S. P., Parra, N. C., & Toledo Alonso, J. R. (2021). Forms and methods for interferon's encapsulation. En *Pharmaceutics* (Vol. 13, Número 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101533>
- Ramraje, G. R., Patil, S. D., Patil, P. H., & Pawar, A. R. (s. f.). *A Brief Review on: Separation Techniques Chromatography*.
- Randerson, D. H. (1985). Large-scale cultivation of hybridoma cells. *Journal of Biotechnology*, 2, 241-255. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(85\)90028-8](https://doi.org/10.1016/0168-1656(85)90028-8)
- Rathore, A. S., Kumar, D., & Kateja, N. (2018). Recent developments in chromatographic purification of biopharmaceuticals. En *Biotechnology Letters* (Vol. 40, Número 6, pp. 895-905). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s10529-018-2552-1>
- Ren, J., Zhang, C., Ji, F., & Jia, L. (2020). Characterization and comparison of two peptide-tag specific nanobodies for immunoaffinity chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1624. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461227>
- Rey, F., Balsari, A., Giallongo, T., Ottolenghi, S., Di Giulio, A. M., Samaja, M., & Carelli, S. (2019). Erythropoietin as a Neuroprotective Molecule: An Overview of Its Therapeutic Potential in Neurodegenerative Diseases. En *ASN Neuro* (Vol. 11). SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/1759091419871420>
- Rocamora, F., Peralta, A. G., Shin, S., Sorrentino, J., Wu, M., Toth, E. A., Fuerst, T. R., & Lewis, N. E. (2023). *Glycosylation Shapes the Efficacy and Safety of Diverse Protein, Gene and Cell Therapies 1 2*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108206>
- Rodrigues, M. E., Costa, A. R., Henriques, M., Cunnah, P., Melton, D. W., Azeredo, J., & Oliveira, R. (2013). Advances and drawbacks of the adaptation to serum-free culture of CHO-K1 cells for monoclonal antibody production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169(4), 1279-1291. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-0068-z>

- Roisman, L. C., Jaitin, D. A., Baker, D. P., & Schreiber, G. (2005). Mutational analysis of the IFNAR1 binding site on IFN α 2 reveals the architecture of a weak ligand-receptor binding-site. *Journal of Molecular Biology*, 353(2). <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.08.042>
- Rondon, A., Mahri, S., Morales-Yanez, F., Dumoulin, M., & Vanbever, R. (2021). Protein Engineering Strategies for Improved Pharmacokinetics. En *Advanced Functional Materials* (Vol. 31, Número 44). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/adfm.202101633>
- Rosenberg, A. S., & Sauna, Z. E. (2018). Immunogenicity assessment during the development of protein therapeutics. En *Journal of Pharmacy and Pharmacology* (Vol. 70, Número 5, pp. 584-594). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jphp.12810>
- Roth, Z., Yehezkel, G., & Khalaila, I. (2012). Identification and Quantification of Protein Glycosylation. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2012, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2012/640923>
- Sakuma, T., Barry, M. A., & Ikeda, Y. (2012). Lentiviral vectors: Basic to translational. En *Biochemical Journal* (Vol. 443, Número 3). <https://doi.org/10.1042/BJ20120146>
- Salamin, O., Kuuranne, T., Saugy, M., & Leuenberger, N. (2018). Erythropoietin as a performance-enhancing drug: Its mechanistic basis, detection, and potential adverse effects. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 464, 75-87. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.01.033>
- 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. *Journal of Biotechnology*, 327, 18-27. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.12.016>
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). Bacterial media, antibiotics and bacterial strains. En *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.
- Sánchez-Trasviña, C., Flores-Gatica, M., Enriquez-Ochoa, D., Rito-Palomares, M., & Mayolo-Deloisa, K. (2021). Purification of Modified Therapeutic Proteins Available on the Market: An Analysis of Chromatography-Based Strategies. En *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.717326>
- Scapin, G., Cagdas, E., Grav, L. M., Lewis, N. E., Goletz, S., & Hafkenschied, L. (2024). Implications of glycosylation for the development of selected cytokines and their derivatives for medical use. En *Biotechnology Advances* (Vol. 77). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2024.108467>
- Schmidt, C. A., Codevilla, C. F., Fronza, M., Girardi Casali, R., & Dalmora, S. L. (2003). Physico-Chemical Characterization and Biological Evaluation of Recombinant Human Erythropoietin in Pharmaceutical Products. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 22(4), 343-350.
- Shargel, L., & Yu, A. B. (2016). *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics* (Seven).

- Shearer, R. F., & Saunders, D. N. (2015). Experimental design for stable genetic manipulation in mammalian cell lines: Lentivirus and alternatives. En *Genes to Cells* (Vol. 20, Número 1, pp. 1-10). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/gtc.12183>
- Shechter, Y., Preciado-Patt, L., Schreiber, G., & Fridkin, M. (2001). Prolonging the half-life of human interferon-2 in circulation: Design, preparation, and analysis of (2-sulfo-9-fluorenylmethoxycarbonyl) 7-interferon-2. *PNAS*. 10.1073/pnas.98.3.1212
- Shental-Bechor, D., & Levy, Y. (2008). Effect of glycosylation on protein folding: A close look at thermodynamic stabilization. *PNAS*. www.pnas.org/cgi/content/full/
- Simon, F., Floros, N., Ibing, W., Schelzig, H., & Knapsis, A. (2019). Neurotherapeutic potential of erythropoietin after ischemic injury of the central nervous system. En *Neural Regeneration Research* (Vol. 14, Número 8, pp. 1309-1312). Wolters Kluwer Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.253507>
- Solá, R. J., & Griebenow, K. (2010). Glycosylation of therapeutic proteins: An effective strategy to optimize efficacy. En *BioDrugs* (Vol. 24, Número 1, pp. 9-21). <https://doi.org/10.2165/11530550-000000000-00000>
- Solá, R. J., Rodríguez-Martínez, J. A., & Griebenow, K. (2007). Modulation of protein biophysical properties by chemical glycosylation: Biochemical insights and biomedical implications. En *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 64, Número 16, pp. 2133-2152). <https://doi.org/10.1007/s00018-007-6551-y>
- Song, J. G., Baral, K. C., Kim, G. L., Park, J. W., Seo, S. H., Kim, D. H., Jung, D. H., Ifekpolugo, N. L., & Han, H. K. (2023). Quantitative analysis of therapeutic proteins in biological fluids: recent advancement in analytical techniques. En *Drug Delivery* (Vol. 30, Número 1). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/10717544.2023.2183816>
- Stoian, I., Manolescu, B., Atanasiu, V., & Lupescu, O. (2007). New alternatives for erythropoietin therapy in chronic renal failure. En *Central European Journal of Medicine* (Vol. 2, Número 4, pp. 361-378). Springer Verlag. <https://doi.org/10.2478/s11536-007-0038-y>
- Stribbling, S. M., & Ryan, A. J. (2022). The cell-line-derived subcutaneous tumor model in preclinical cancer research. *Nature Protocols*, 17(9), 2108-2128. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00709-3>
- Sumer-Bayraktar, Z., Kolarich, D., Campbell, M. P., Ali, S., Packer, N. H., & Thaysen-Andersen, M. (2011). N-glycans modulate the function of human corticosteroid-binding globulin. *Molecular and Cellular Proteomics*, 10(8). <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.009100>
- Suresh, S., Rajvanshi, P. K., & Noguchi, C. T. (2020). The Many Facets of Erythropoietin Physiologic and Metabolic Response. En *Frontiers in Physiology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01534>

- Svecla, M., Li-Gao, R., Falck, D., & Bonacina, F. (2025). N-glycosylation signature and its relevance in cardiovascular immunometabolism. *Vascular Pharmacology*, 159. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2025.107474>
- Tejwani, V., Andersen, M. R., Nam, J. H., & Sharfstein, S. T. (2018). Glycoengineering in CHO Cells: Advances in Systems Biology. En *Biotechnology Journal* (Vol. 13, Número 3). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/biot.201700234>
- Thomas, C., Moraga, I., Levin, D., Krutzik, P. O., Podoplelova, Y., Trejo, A., Lee, C., Yarden, G., Vleck, S. E., Glenn, J. S., Nolan, G. P., Piehler, J., Schreiber, G., & Garcia, K. C. (2011). Structural linkage between ligand discrimination and receptor activation by Type I interferons. *Cell*, 146(4). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.048>
- Thompson, N., & Wakarchuk, W. (2022). O-glycosylation and its role in therapeutic proteins. En *Bioscience Reports* (Vol. 42, Número 10). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/BSR20220094>
- Tihanyi, B., & Nyitray, L. (2020). Recent advances in CHO cell line development for recombinant protein production. En *Drug Discovery Today: Technologies* (Vol. 38, pp. 25-34). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2021.02.003>
- Tomomori-Sato, C., Sato, S., Conaway, R. C., & Conaway, J. W. (2013). Immunoaffinity purification of protein complexes from mammalian cells. *Methods in Molecular Biology*, 977, 273-287. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-284-1_22
- Torres-Obreque, K. M., Meneguetti, G. P., Muso-Cachumba, J. J., Feitosa, V. A., Santos, J. H. P. M., Ventura, S. P. M., & Rangel-Yagui, C. O. (2022). Building better biobetters: From fundamentals to industrial application. En *Drug Discovery Today* (Vol. 27, Número 1, pp. 65-81). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.08.009>
- Traenkle, B., Segan, S., Fagbadebo, F. O., Kaiser, P. D., & Rothbauer, U. (2020). A novel epitope tagging system to visualize and monitor antigens in live cells with chromobodies. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71091-x>
- Tsumoto, K., Ogasahara, K., Ueda, Y., Watanabe, K., Yutani, K., & Kumagai, I. (1996). Role of Salt Bridge Formation in Antigen-Antibody Interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 271(51). <https://doi.org/10.1074/jbc.271.51.32612>
- U.S. Food and Drug Administration. (2023). *Potency Assurance for Cellular and Gene Therapy Products Draft Guidance for Industry*. <https://www.fda.gov/media/79856/download>.
- van der Valk, J., Bieback, K., Buta, C., Cochrane, B., Dirks, W. G., Fu, J., Hickman, J. J., Hohensee, C., Kolar, R., Liebsch, M., Pistollato, F., Schulz, M., Thieme, D., Weber, T., Wiest, J., Winkler, S., & Gstraunthaler, G. (2018). Fetal Bovine Serum (FBS): Past – Present – Future. *Altex*, 35(1), 99-118. <https://doi.org/10.14573/altex.1705101>
- Van Landuyt, L., Lonigro, C., Meuris, L., & Callewaert, N. (2019). Customized protein glycosylation to improve biopharmaceutical function and targeting. En *Current Opinion in*

- Biotechnology* (Vol. 60, pp. 17-28). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.11.017>
- Villaraza, C. J., Antuña, S., Tardivo, M. B., Rodríguez, M. C., Mussio, P., Cattaneo, L., Fontana, D., Díaz, P. U., Ortega, H. H., Tríbulo, A., Macagno, A., Bó, G. A., Ceaglio, N., & Prieto, C. (2021). Development of a suitable manufacturing process for production of a bioactive recombinant equine chorionic gonadotropin (reCG) in CHO-K1 cells. *Theriogenology*, 172. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.05.013>
- Vyas, K., Brassard, D. L., DeLorenzo, M. M., Sun, Y., Grace, M. J., Borden, E. C., & Leaman, D. W. (2003). Biologic Activity of Polyethylene Glycol 12000-Interferon-2b Compared with Interferon-2b: Gene Modulatory and Antigrowth Effects in Tumor Cells. *Journal of Immunotherapy*, 26, 202-211. <https://doi.org/10.1097/00002371-200305000-00004>.
- Walsh, G., & Walsh, E. (2022). Biopharmaceutical benchmarks 2022. *Nature Biotechnology*, 40(12), 1722-1760. <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01582-x>
- Walter, M. R. (2020). The Role of Structure in the Biology of Interferon Signaling. En *Frontiers in Immunology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.606489>
- Wandel-Petersen, V., Bürgi, M. D. L. M., & Oggero, M. (2021). *Optimización de un enzimoimmunoensayo para la evaluación farmacocinética de variantes hiperglicosiladas de eritropoyetina humana (hEPO)* [Tesina para optar por el título de Licenciatura en Biotecnología]. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas - Universidad Nacional del Litoral.
- Wang, Y., Wang, M., Zhou, L., Geng, X., Xu, Z., & Zhang, H. (2023). Development of a competitive ELISA based on estrogen receptor and weak competitive molecule for the screening of potential estrogens in foods. *Food Chemistry*, 401. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134084>
- White, J. R., Abodeely, M., Ahmed, S., Debaube, G., Johnson, E., Meyer, D. M., Mozier, N. M., Naumer, M., Pepe, A., Qahwash, I., Rocnik, E., Smith, J. G., Stokes, E. S. E., Talbot, J. J., & Wong, P. Y. (2019). Best practices in bioassay development to support registration of biopharmaceuticals. *BioTechniques*, 67(3), 126-137. <https://doi.org/10.2144/btn-2019-0031>
- Xian, S., & Moh, E. (2018). *Platforms for In Vitro Glycoengineering of proteins* [Doctor of Philosophy].
- Xue, D., Hsu, E., Fu, Y. X., & Peng, H. (2021). Next-generation cytokines for cancer immunotherapy. En *Antibody Therapeutics* (Vol. 4, Número 2, pp. 123-133). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/abt/tbab014>
- Yadav, D. K., Yadav, N., Yadav, S., Haque, S., & Tuteja, N. (2016). An insight into fusion technology aiding efficient recombinant protein production for functional proteomics. En *Archives of Biochemistry and Biophysics* (Vol. 612). <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.10.012>

- Yang, X., Pistolozzi, M., & Lin, Z. (2018). New trends in aggregating tags for therapeutic protein purification. En *Biotechnology Letters* (Vol. 40, Número 5). <https://doi.org/10.1007/s10529-018-2543-2>
- Yang, Z., Drew, D. P., Jørgensen, B., Mandel, U., Bach, S. S., Ulvskov, P., Lavery, S. B., Bennett, E. P., Clausen, H., & Petersen, B. L. (2012). Engineering mammalian mucin-type O-glycosylation in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 287(15), 11911-11923. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.312918>
- Yao, T., & Asayama, Y. (2017). Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. En *Reproductive Medicine and Biology* (Vol. 16, Número 2, pp. 99-117). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12024>
- Yuan, W. M., Zhang, R., Zhang, Q., Ma, F. L., Wang, C., Wang, Y. Z., Zeng, Y., & Zheng, L. S. (2018). The generation and biological activity of a long-lasting recombinant human interferon-1. *Protein Engineering, Design and Selection*, 31(9), 355-360. <https://doi.org/10.1093/protein/gzy029>
- Yuan, W. mei, Zhang, W. ju, Ma, F. lian, Li, J. song, Zhang, Q., & Zheng, L. shu. (2017). IFN- λ 1 in CHO cells: Its expression and biological activity. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s11658-017-0057-x>
- Zaman, R., Islam, R. A., Ibrat, N., Othman, I., Zaini, A., Lee, C. Y., & Chowdhury, E. H. (2019). Current strategies in extending half-lives of therapeutic proteins. En *Journal of Controlled Release* (Vol. 301, pp. 176-189). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.02.016>
- Zhang, Q., Wang, C., Ma, F., Yao, L., Gao, H., Zhu, L., & Zheng, L. (2020). Development and biological activity of long-acting recombinant human interferon- α 2b. *BMC Biotechnology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12896-020-00605-2>