



## Plan de Gestión de Datos

### INFORMACIÓN SOBRE EL PROYECTO

#### 1. – Datos del Proyecto

##### - Título del Proyecto (en castellano)

Nuevos candidatos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas

##### - Título del Proyecto (en inglés)

Novel therapeutic candidates for the treatment of neurodegenerative diseases

##### - Descripción del Proyecto (en castellano) Resumen

La eritropoyetina humana (hEPO) es una citoquina glicosilada, cuya función principal es la eritropoyesis. Se han descubierto otras funciones para la hEPO que han expandido las expectativas de su uso clínico a nivel de neuroprotección y neuroplasticidad.

La hEPO recombinante (rhEPO) es una droga segura y bien tolerada para el tratamiento de anemia, pero al proyectar su empleo como neuroprotector, sus efectos hematopoyéticos se convierten en efectos secundarios.

Nuestro laboratorio ha innovado mediante glicoingeniería en la producción, con fines neuroterapéuticos, de variantes de hEPO en las cuales se introdujo un sitio adicional y susceptible de N-glicosilación en regiones de la hEPO responsables de su actividad eritropoyética, sin afectar la región responsable de su accionar en la protección y plasticidad neuronal. Esto nos ha permitido la presentación de dos solicitudes de patentamiento, una ante el INPI y otra ante la WIPO.

La glicosilación cumple un rol fundamental sobre las propiedades farmacocinéticas de la proteína, así como sobre su estabilidad y su actividad biológica. Basados en tal modificación proponemos realzar las propiedades de las moléculas derivadas de hEPO de modo de generar variantes novedosas.

Por un lado, obtener moléculas con un perfil de glicosilación menos ácido y, por lo tanto, de mayor similitud con respecto a la EPO producida por cerebro, proponiendo la utilización de las células humanas HEK293 capaces de producir proteínas conteniendo glicoisofomas más básicas que las producidas por células CHO-K1.

Por otro lado, la propiedad de las células HEK293 para generar moléculas con estructuras de glicanos menos ácidos podría conducir a una desventaja farmacocinética. Por este motivo, se incorporarán dos sitios potenciales de N-glicosilación en regiones identificadas como esenciales para desplegar su acción hematopoyética de modo de lograr mejoras desde el punto de vista de su estabilidad en sangre, farmacocinética y reducida inmunogenicidad.

En conclusión, el proyecto trabajará en la mejora de las capacidades de las moléculas propuestas como candidatos terapéuticos, con el fin de incrementar su eficacia en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, evitando los efectos secundarios de la hematopoyesis y cambios en la inmunogenicidad.

##### - Descripción del Proyecto (en inglés) Resumen

Human erythropoietin (hEPO) is a glycosylated cytokine, whose main function is erythropoiesis. Other functions for hEPO have been discovered, expanding its clinical expectations to produce neuroprotection and neuroplasticity in CNS-derived pathologies.

Recombinant hEPO (rhEPO) is a safe and well-tolerated drug for the treatment of anemia, but its hematopoietic effects become into side effects when its use is projected as a neuroprotective agent.

For neurotherapeutic purposes, our laboratory has innovated in the production of hEPO variants through glycoengineering in which an additional site susceptible to N-glycosylation was introduced into regions of hEPO responsible for its erythropoietic activity, without affecting



the region responsible for its action on the protection and neuronal plasticity. This has allowed us to file two patent applications, one with INPI and the other with WIPO.

Glycosylation plays a fundamental role in the pharmacokinetic properties of the protein, as well as in its stability and biological activity. Based on such modification we propose to enhance the properties of the hEPO-derived molecules to generate novel variants having less acidic glycosylation profile and thus, to confer greater similarity to that of the brain-produced EPO. For that, we propose the use of human HEK293 cells capable of producing proteins containing more basic glycoforms than those produced by CHO-K1 cells.

Nevertheless, the property of HEK293 cells to generate molecules with less acidic glycan structures could lead to a pharmacokinetic disadvantage. For this reason, two potential N-glycosylation sites will be incorporated in regions identified as essential to display their hematopoietic action to achieve improvements of their stability in blood, pharmacokinetics and reduced immunogenicity.

In conclusion, the project will work on improving the capacities of the molecules proposed as therapeutic candidates for increasing their efficacy in the treatment of neurodegenerative diseases, avoiding the side effects of hematopoiesis and changes in immunogenicity.

**- Palabras Claves descriptivas del Proyecto (en castellano)**

eritropoyetina                      glicoingeniería                      neuroprotección/neuroplasticidad

**- Palabras Claves descriptivas del Proyecto (en inglés)**

erythropoietin                      glycoengineering                      neuroprotection/neuroplasticity

**2 – Datos del Director/ar del Proyecto**

**- Nombre y Apellido**

Marcos Rafael Oggero Eberhardt

**- Unidad Académica**

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

**- Teléfono oficial de contacto**

0342 451 5215 int 193

**-Teléfono móvil de contacto**

03492 15643794

**-E-mail del Director/a del Proyecto**

moggero@fbc.unl.edu.ar

**DATOS RESULTANTES DE LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO**

**-Describe la toma de muestras / datos a realizar**

En función de la metodología descrita en el plan de trabajo, se mencionan las muestras y/o datos más importantes a obtener describiendo cada etapa del mencionado plan:

**1- Expresión de variantes de hEPO portando un sitio adicional de N-glicosilación a partir de líneas celulares estables obtenidas mediante transducción de células HEK293. Producción a gran escala.**

Monitoreo de los cultivos mediante determinación de la concentración de células totales y viables. Cosecha de sobrenadantes de cultivo a partir de la producción en gran escala. Evaluación de las concentraciones de cada muteína mediante técnica de ELISA sándwich.

**2- Obtención de muteínas de hEPO que porten dos sitios adicionales y potenciales de N-glicosilación en la región molecular responsable de la hematopoyesis**

Determinación de la incorporación de la mutación mediante técnica de PCR. Análisis de los clones generados mediante digestión con enzimas de restricción para garantizar la incorporación de la secuencia de ADN obtenida por PCR. Cuantificación del título de partículas lentivirales mediante un ELISA comercial p24 de manera de asegurar el título adecuado de pLVs para la transducción de células HEK293 y/o CHO-K1. Evaluación de la expresión de las muteínas luego de la transducción, analizando los sobrenadantes de cultivos mediante ELISA sándwich.

**3- Purificación de las variantes de hEPO mediante cromatografía de inmunoafinidad**

Análisis de la recuperación del proceso cromatográfico mediante técnica de ELISA sándwich y determinación de la pureza de los eluatos mediante SDS-PAGE y posterior tinción con colorante azul



brillante de Coomasie.

- 4- Caracterización fisicoquímica de las muteínas de hEPO producidas**  
Obtención de datos de la masa molecular de las muteínas mediante SDS-PAGE, identidad mediante *Western blot* y pl de las mismas mediante técnica de IEF.
- 5- Análisis del contenido glicosídico de las muteínas**  
Obtención de datos del contenido de ácido siálico y restantes monosacáridos para calcular la composición de los mismos en las estructuras glicosídicas. Determinación de la composición de glicanos neutros y cargados y descripción de las estructuras oligosacarídicas dominantes.
- 6- Evaluación de la estabilidad de las proteínas producidas en células CHO-K1 y HEK293**  
Se analizarán los datos de actividad neuroprotectora *in vitro* en función de las temperaturas de incubación y actividad de proteasas. Asimismo, se obtendrán datos de las concentraciones de la proteína nativa evaluadas mediante ELISA sándwich.
- 7- Evaluación farmacocinética de las variantes derivadas de hEPO**  
La toma de muestras de sangre de los animales se realizará a diferentes tiempos posinyección (entre 1h. y 120 h) y se evaluarán los datos de concentración obtenidos a partir del ELISA sándwich.
- 8- Evaluación de la actividad biológica eritropoyética, neuroprotectora y neuroplástica *in vitro* de las muteínas de hEPO**  
Para la actividad eritropoyética se obtendrán datos de la proliferación de células eritroides humanas incubadas con dichas variantes, lo cual se espera produzcan una disminución o inhibición de dicha proliferación. Con relación a la actividad neuroprotectora se obtendrán datos del nivel de apoptosis de células de hipocampo de ratas neonatales tratadas con el inductor apoptótico estrosoprina. Durante la evaluación de neuroplasticidad se obtendrán datos correspondientes a la medición de neuritas, filopodios y establecimiento de conexiones sinápticas empleando para las dos últimas mediciones el mismo tipo celular anteriormente mencionado y para la primera (neuritas) se emplearán células N2A derivadas de ratas.
- 9- Ensayo de evaluación de la inmunogenicidad *ex vivo***  
Se obtendrán datos de concentraciones de las citoquinas IFN- $\gamma$  e IL-4 determinadas mediante ELISA sándwich, con el fin de analizar el perfil Th1 o Th2 de la respuesta linfoproliferativa.

En todos los ensayos se incluirán controles positivo (hEPO) y negativo (PBS), que se utilizarán para efectuar comparaciones entre los mismos y los efectos obtenidos por las muestras. Asimismo, serán utilizados en las determinaciones analíticas para establecer las diferencias significativas en los tratamientos. Además, toda la información recolectada a lo largo de los ensayos se documentará en libros de acta y en formato electrónico. Los resultados de cada ensayo serán analizados utilizando distintos tipos de *software* apropiados para el procesamiento de los datos.

**– Datos: ¿Existe alguna razón por la cual los datos declarados no deban ser puestos a disposición de la comunidad/ser de acceso público? (marque X)**

	<b>NO</b>
<b>X</b>	<b>SI. Elija una de las opciones:</b>
	a) Se encuentra en evaluación de protección por medio de patentes
	b) No se inició el proceso de evaluación de patentabilidad, pero podría ser protegible
	c) Existe un contrato con un tercero que impide la divulgación
	d) Otro. Se solicita confidencialidad debido a que los resultados serán parte de una publicación científica en una revista especializada del área, para lo cual es necesario que los datos no hayan sido publicados con anterioridad.



– **Período de Confidencialidad:** Es el período durante el cual los datos no deberían ser publicados, contado a partir del momento de la toma de los mismos. El período máximo para la no publicación es de 5 (CINCO) años posteriores a su obtención. Luego de este periodo, los datos estarán disponibles para la comunidad/serán de acceso público.

Si Ud. considera que este tiempo es insuficiente, y necesita prorrogar el período de confidencialidad, indique sus motivos y la cantidad de años adicionales que considera necesarios. Marque su opción con "X".

	1 (UN) año
	2 (DOS) años
X	3 (TRES) años
	4 (CUATRO) año
	5 (CINCO) años
	Otro.
	Motivos:

Santa Fe, 29 de abril de 2020

Marcos Oggero-Eberhardt



## **INSTRUCTIVO PARA COMPLETAR EL PLAN DE GESTIÓN (PGD)**

El PGD no es un documento definitivo, sino que se desarrollará a lo largo del ciclo de vida del proyecto.

### **INFORMACIÓN SOBRE EL PROYECTO**

#### **1 – Datos del Proyecto**

**Título del Proyecto (en castellano):** Deberá ingresar el título completo del proyecto (en castellano), indicando además el código asignado por la SCAyT.

**Título del Proyecto (en inglés):** Deberá ingresar el título completo del proyecto en inglés.

**Descripción del Proyecto (en castellano):** Deberá ingresar la descripción del Proyecto en castellano.

**Descripción del Proyecto (en inglés):** Deberá ingresar la descripción del Proyecto en inglés.

**Palabras Claves descriptivas del Proyecto (en castellano):** Deberá ingresar tres palabras claves descriptivas del Proyecto, en castellano.

**Palabras Claves descriptivas del Proyecto (en inglés):** Deberá ingresar tres palabras claves descriptivas del Proyecto, en inglés.

#### **2- Datos del Director/a del Proyecto**

**Nombre y Apellido del Titular del Proyecto:** Nombre completo y apellido del Titular del Proyecto.

**Unidad Académica:** Nombre de la Unidad Académica a la que pertenece el/la directora/a del Proyecto.

**Teléfono oficial de contacto:** Número de teléfono de la oficina/laboratorio/Institución del Director/a del Proyecto, donde pueda ser contactado, incluyendo número de área/país (ej: Para Santa Fe: + 54 9 342 4999-9999).

**Teléfono móvil de contacto:** Número de teléfono móvil del director/ar del Proyecto, donde pueda ser contactado, incluyendo número de área/país.

**E-mail del Director/a del Proyecto:** Correo electrónico de contacto del Director/a del Proyecto.

### **DATOS RESULTANTES DE LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO**

**Describe la toma de muestras/datos a realizar:** Información descriptiva sobre la toma de muestras que resultarán en datos/conjuntos de datos. La descripción deberá



incluir información de contexto (lugar de toma de los datos; instrumentos, etc.)

**Datos: ¿Existe alguna razón por la cual los datos declarados no deban ser puestos a disposición de la comunidad/ser de acceso público? Deberá marcar con una “X” la opción correcta.** En caso de responder afirmativamente, deberá justificar debidamente, comprendiendo que sólo en casos de extrema excepcionalidad esta restricción de acceso a los datos resulta practicable/aceptable.

**Período de Confidencialidad: Es el periodo durante el cual los datos no deberían ser publicados, contado a partir del momento de la toma de los mismos. El periodo máximo para la no publicación es de 5 (CINCO) años posteriores a su obtención. Luego de este periodo, los datos estarán disponibles para la comunidad/serán de acceso público.**

**Si Ud. considera que este tiempo es insuficiente, y necesita prorrogar el período de confidencialidad, indique sus motivos y la cantidad de años adicionales que considera necesarios.**

Deberá indicar los años que considera necesario prorrogar el período de confidencialidad y explicar los motivos.