

## INNOVACIÓN EN BIOTERAPÉUTICOS: Desarrollo de una versión mejorada de IFN- $\beta$ -1a para el tratamiento de Esclerosis Múltiple e infecciones virales

Lisa, Maia<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> UNL, CONICET, FBCB (Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas), CBL (Centro Biotecnológico del Litoral),  
Ciudad Universitaria, Ruta Nacional 168, Km 472.4, C.C. 242, Santa Fe S3000ZAA, Argentina

<sup>2</sup> Laboratorio de Modelado Molecular, FBCB (Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas), Ciudad  
Universitaria, Ruta Nacional 168, Km 472.4, C.C. 242, Santa Fe S3000ZAA, Argentina

Director: Garay, Alberto Sergio

Codirector: Mufarrege, Eduardo Federico

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Bioterapéuticos, IFN $\beta$ , Dinámica Molecular

### INTRODUCCIÓN

La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad crónica neurodegenerativa que se produce cuando el propio sistema inmune ataca al encéfalo y la médula espinal. El IFN $\beta$ -1a-WT (W) recombinante es un producto biológico (glicoproteína) que ha sido ampliamente utilizado como tratamiento para la EM e infecciones virales desde hace más de cuatro décadas. Sin embargo, su aplicabilidad es limitada, debido a que presenta riesgos de inmunogenicidad (induce una respuesta indeseada del sistema inmune, al reconocerlo como un agente extraño), lo que compromete la eficacia del tratamiento y la seguridad del paciente. Recientemente, en el Centro Biotecnológico del Litoral, se han desarrollado dos variantes con inmunogenicidad reducida, denominadas IFN $\beta$ -1a-VAR1 (V1) e IFN $\beta$ -1a-VAR2 (V2) (Ricotti et al, 2023).

La Dinámica Molecular (DM) es una herramienta computacional que permite obtener una simulación que muestra el comportamiento de los átomos de una molécula y cómo evoluciona su interacción en el tiempo, regida por las leyes de la física. A partir de una Dinámica Molecular se pueden visualizar y estudiar procesos complejos. En este trabajo se utilizó esta herramienta para estudiar la evolución estructural de las proteínas W, V1 y V2, y sus respectivas interacciones con la glicosilación.

### OBJETIVOS

- Estudiar la estabilidad térmica de las variantes glicosiladas de IFN $\beta$ -1a.
- Analizar los efectos de las mutaciones y la glicosilación en la estructura y estabilidad de las variantes de IFN $\beta$ -1a.

Título del proyecto: Estudio de propiedades fisicoquímicas de biomoléculas y sistemas biomiméticos mediante técnicas de Modelado Molecular

Instrumento: CAID

Año convocatoria: 2021

Organismo financiador: UNL

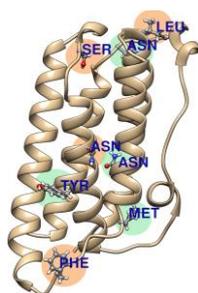
Director: Rodrigues, Daniel

Co-Director: Garay, Alberto Sergio

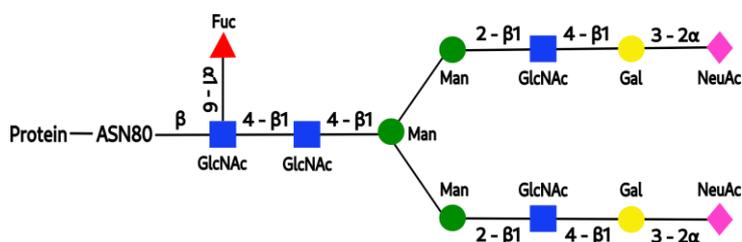


## METODOLOGÍA

Para llevar a cabo la DM se construyó la configuración inicial de los sistemas a partir del PDB 1AU1 (Karpusas et al, 1997), de la estructura cristalizada de Interferón Beta Humano. Ésta fue mutada con el Software de visualización molecular UCSF-Chimera en los residuos 25, 60, 117 y 158 para generar la variante V1 y, adicionalmente, en los residuos 28, 65, 74 y 111 (la *Figura 1* muestra dónde se encuentran los residuos mutados), para generar la variante V2. Posteriormente, a estos sistemas se les agregó una glicosilación en el residuo ASN 80 (La secuencia de la glicosilación se presenta en la *Figura 2*), con el Software Doglycans, para generar los sistemas glicosilados WG, V1G y V2G. La glicosilación utilizada para estas simulaciones es la reportada como mayoritaria en los análisis de IFN $\beta$ -1a (Mastrangeli et al, 2015).



**Figura 1:** W representada como *ribbons* y resaltados los residuos que serán mutados en V1 (celestes) y en V2 (rosa).



**Figura 2:** esquema bidimensional de la glicosilación utilizada en las simulaciones. Se muestran los residuos de azúcares que la conforman y los enlaces que los unen.

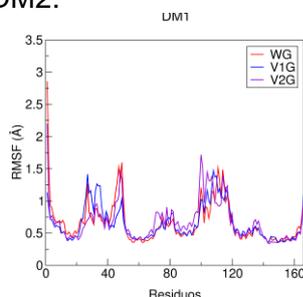
Se realizaron dos simulaciones de Dinámica Molecular, denominadas DM1 y DM2.

- DM1: 3  $\mu$ s para cada sistema (W, V1, V2, WG, V1G, V2G). Antes de comenzar la dinámica, a los sistemas glicosilados se les realizó un tratamiento térmico, aumentando la temperatura de simulación a 400 K durante 1 ns. El resto de la Dinámica se realizó a 300 K.
- DM2: 5 simulaciones de 1,5  $\mu$ s cada una, para las tres variantes glicosiladas (WG, V1G y V2G). El tratamiento térmico que recibieron estos sistemas fue de 368 K durante 50 ns, el resto de la Dinámica se realizó a 300 K.

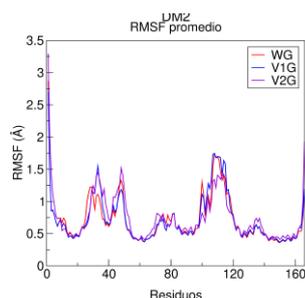
## RESULTADOS

### Análisis de la estructura proteica

Para estudiar la estabilidad térmica de las tres variantes de IFN $\beta$ -1a a alta temperatura, se compararon las fluctuaciones estructurales del esqueleto peptídico (*Root Mean Square Fluctuation (RMSF)*) de las variantes glicosiladas obtenidas en la DM1 y las obtenidas en la DM2.



**Figura 3:** Gráfico de RMSF de las variantes glicosiladas de la DM1. Se muestra el valor de RMSF de cada residuo aminoacídico respecto del esqueleto promedio de la proteína, obtenido en el tiempo de equilibrio de la Dinámica Molecular realizada.



**Figura 4:** Gráfico de RMSF de las variantes glicosiladas de la DM2. Para cada variante se realizaron 5 DMs distintas; en cada una de ellas se obtuvo el esqueleto promedio de la proteína en el tiempo de equilibrio; sobre estos esqueletos promedio, se calculó el valor de RMSF para cada residuo. Para facilitar la comprensión y visualización de los datos, se calculó el promedio de los valores de RMSF obtenidos en las 5 simulaciones de cada variante, obteniendo así un valor de RMSF promedio para cada residuo de la proteína.

En las Figuras 3 y 4 se observa que las simulaciones de las variantes glicosiladas de DM1 y DM2 presentan valores de RMSF, en general, bajos. Los picos de RMSF corresponden, en ambos casos, a los *loops* de la proteína (regiones de alta variabilidad). Los residuos correspondientes a las hélices  $\alpha$  presentan valores de RMSF entre 0,5 y 1 Å. Las hélices se mantienen estables durante toda la simulación.

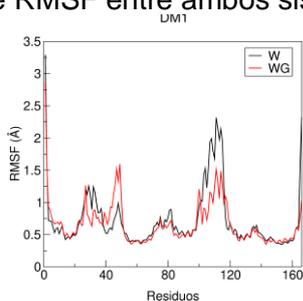
Se realizó un análisis estadístico ANOVA para evaluar si existe diferencia significativa entre los valores de RMSF de las variantes glicosiladas, en ambas DMs. Los resultados obtenidos se muestran en la *Tabla 1*.

**Tabla 1:** valores de P-value y F-value obtenidos al realizar el test estadístico ANOVA entre los grupos.  $H_0$ : no hay diferencia significativa entre las medias de los grupos.

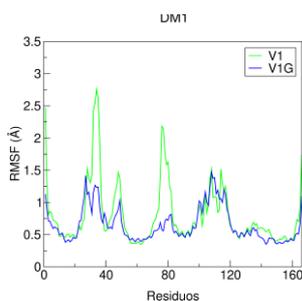
Grupos	$\alpha$	$F_{critical}$	P-value	F-value	Resultado
DM1: WG, V1G y V2G	0,05	3,01	0,725	0,32	No rechazo $H_0$
DM2: WG, V1G y V2G	0,05	3,01	0,598	0,51	No rechazo $H_0$
WG-DM1, WG-DM2	0,05	3,86	0,205	1,61	No rechazo $H_0$
V1G-DM1, V1G-DM2	0,05	3,86	0,050	3,86	No rechazo $H_0$
V2G-DM1, V2G-DM2	0,05	3,86	0,047	3,95	Rechazo $H_0$

Del análisis estadístico se determina que no existe evidencia suficiente para afirmar que los valores medios de RMSF de las variantes glicosiladas de la DM1 sean diferentes. La misma conclusión se extiende a las variantes glicosiladas de la DM2. Además, al comparar entre ambas simulaciones (que tuvieron distinto tratamiento térmico), vemos que tampoco existe evidencia suficiente para afirmar que los valores de RMSF de las variantes WG y V1G sean diferentes entre sí. Sin embargo, existe una diferencia significativa entre los valores de RMSF de la variante V2G en la DM1 y la DM2.

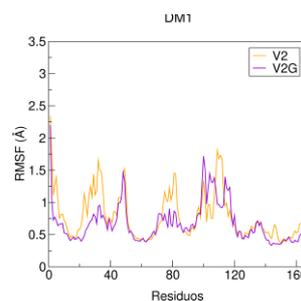
A partir de la comparación de los RMSF de las variantes glicosiladas y deglicosiladas (*Figura 5, 6 y 7*) se confirmó el rol estabilizador de la glicosilación descrito por otros autores (Runkel et al, 1998; Solá et al, 2005), ya que se observa una drástica disminución en el valor de RMSF entre ambos sistemas.



**Figura 5:** gráfico de RMSF de las variantes W y WG.



**Figura 6:** gráfico de RMSF de las variantes V1 y V1G.



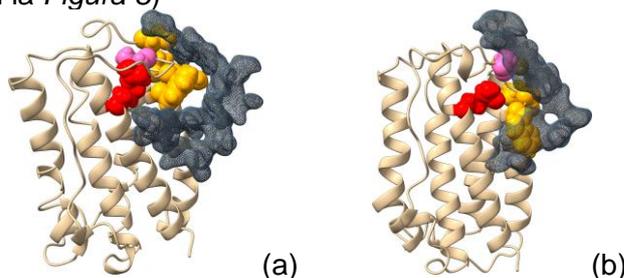
**Figura 7:** gráfico de RMSF de las variantes V2 y V2G.

### Análisis de la estructura glucídica

Para estudiar la estructura de la glicosilación se realizó un *clustering* en las simulaciones de las variantes glicosiladas de la DM1 y la DM2. De este análisis se obtuvieron los esqueletos promedio de la glicosilación de cada sistema simulado y, al comparar el *Root-Mean-Square Deviation of atomic positions* (RMSD), se observó que en cada simulación la glicosilación

adquirió distintas conformaciones promedio. No se observó ningún patrón estructural que dependa del tratamiento térmico o de las mutaciones de las variantes.

Con el objetivo de reconocer las regiones de la misma que podrían estar bloqueadas para su unión a su receptor específico, se calculó el factor de oclusión de la proteína respecto a la glicosilación para todas las simulaciones de las variantes glicosiladas. Se obtuvo un valor  $f$ , ( $0 \leq f \leq 1$ ) que representa el grado de oclusión de los residuos aminoacídicos de la proteína por efecto de la glicosilación. Se encontró que las 3 variantes (WG, V1G y V2G) presentan los mismos residuos ocluidos (considerando como criterio de corte  $f \geq 0,5$ ): TRP 22, GLN 23, ASN 80 e ILE 83. Además, las variantes V1G y V2G también presentan ocluidos los residuos PRO 25 (mutado respecto a WG) y ARG 147 (próximo espacialmente PRO 25) (Ver esquema en la Figura 8)



**Figura 8:** En gris se observa la superficie de la glicosilación; en naranja los residuos 22, 23, 80 y 83; en rosa el 25 y en rojo el 147. (a) WG: se distingue que los residuos 25 y 147 están alejados de la glicosilación. (b) V2G: se observa como los residuos 25 y 147 se acercan a la glicosilación.

## CONCLUSIONES

La glicosilación adopta distintas conformaciones en cada una de las simulaciones y estas no se relacionan con las mutaciones efectuadas. Tampoco se observa que las mismas tengan un efecto desestabilizante sobre ninguna de las variantes, por el contrario, se encontró que una de las mutaciones (N25P) aumenta la interacción proteína-glicano, lo que podría estar estabilizando aún más a las variantes V1 y V2. Se estima que al mutar la Asparagina 25 por una Prolina, las interacciones entre este residuo y el residuo 147 cambian, lo que aumentaría su interacción con la glicosilación. Sin embargo, es necesario realizar más ensayos para corroborar esta hipótesis.

Estos resultados, analizados en conjunto con los experimentos *in vivo* e *in vitro* realizados por el grupo de trabajo, demuestran el desarrollo de una variante de IFN $\beta$ -1a con inmunogenicidad reducida y estabilidad térmica aumentadas, destacando este nuevo bioterapéutico como un candidato prometedor para el tratamiento de EM.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Karpusas, M. et al**, 1997. The crystal structure of human interferon  $\beta$  at 2.2-Å resolution. Proceedings of the National Academy of Sciences, 92, 11813-11818.
- Mastrangeli, R. et al**, 2015. In vitro biological characterization of IFN-  $\beta$ -1a major glycoforms. Glycobiology, 25, 21-29.
- Ricotti, S. et al**, 2023. Development of IFN $\beta$ -1a versions with reduced immunogenicity and full in vitro biological activity for the treatment of multiple sclerosis. Clinical Immunology, 257, 109831.
- Runkel, L. et al**, 1998. Structural and functional differences Between Glycosylated and Non-glycosylated Forms of Human Interferon-B (IFN-B). Pharmaceutical Research, 15.
- Solá, R. et al**, 2009. Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals. Journal of pharmaceutical sciences, 98, 1223-1245.