

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas

TECNOLOGÍA DE PRODUCCIÓN DE MUTEÍNAS HIPERGLICOSILADAS DE ERITROPOYETINA HUMANA

Lic. Francisco Iturraspe Castellví

Director: Dr. Marcos Oggero Eberhardt

Co-directora: Dra. María de los Milagros Bürgi Fissolo

Lugar de realización:

Centro Biotecnológico del Litoral

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas

Universidad Nacional del Litoral

-2025-

You don't form in the wet sand

You don't form at all

You don't form in the wet sand

I do

AGRADECIMIENTOS

Se cierra un capítulo sumamente importante en mi vida, y resulta imposible no agradecer a todas las personas que de una forma directa o indirecta participaron de esta etapa.

A mi familia, que siempre estuvo cerca desde el primer momento. A mamá y papá, mis modelos a seguir, por bancarme en cada paso que doy en la vida, por aconsejarme, por enseñarme lo que es el esfuerzo y el sacrificio, pero, sobre todo, enseñarme a ser buena persona. A mis hermanos Tini, Ati y Lola, por su compañía de todos los días. A mis abuelos Marinés, Eco, Pelado y Teté, por el amor y cariño de abuelos que sólo ellos saben dar y por interesarse en el tema que trabajé a pesar de que no terminen de entender del todo o se les olvide la mayor parte.

A Marina y Ricardo, por abrirme las puertas para poder formar parte de este excelente grupo de personas que conformamos el CBL y compartirme su enorme experiencia.

A mis directores Marcos y Mili, por su enseñanza y guía constante, por la gran cantidad de oportunidades que me dieron, por su enorme paciencia conmigo. Gracias también por ayudarme a mejorar como profesional en este campo tan lindo que es la biotecnología.

A mis compañeros y amigos del laboratorio que tuvieron un paso por ahí o los que siguen estando, por la alegría y buena onda de todas las mañanas, los congresos, las catarsis, los mates, los “Miércoles de Harinas”, las juntadas, los “Fútbol 5 del CBL” y el último viaje a Chile que tanto disfruté. Como les he dicho en varias oportunidades, yo no estaría en este momento si no fuera por ustedes. Gracias a los antiguos referentes: Batta, Soni, Sofi, Fer y Anto. A los del grupo de siempre: Erne, Jesu, Lu, Male, Juli P., Delfi, Copo, Pablo, Flor, Juli L. y Juani. Mención aparte para Javi, mi “*tesisbro*”, mi mejor amigo y cómplice dentro del laboratorio. A mis chiquitos de “la tribu”, Juan, Mai y Franche, quienes cariñosamente me nombraron su cacique en la oficina y con quienes tuve la suerte de compartir en la diaria los últimos meses. Gracias también a Jose, Vicki G., Lautá L., Joa, Tulio, Emma, Belu A., Belu B., Kimi, Seba A., Belén T., David S., Pony y Vale.

A los investigadores del CBL por compartir su experiencia, sugerencias y consejos: Edu, Guli, Nati, Diego, Claudio, Celeste, Ale y Matías. Gracias Andre por tu enorme predisposición para ayudar en cualquier cosa por más mínima que sea, y un agradecimiento especial al gran Doc Orozco por su ayuda y sus anécdotas en las largas jornadas de farmacocinética.

AGRADECIMIENTOS

Al grupo de desarrollo de Zelltek, con quienes tuve la suerte de compartir muchos años y que en varias ocasiones ofrecieron su ayuda desinteresada, enseñando a usar o prestando algún material o equipo.

A Camila y Rocío del Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, por los ensayos realizados que me permitieron cerrar con “broche de oro” este trabajo de tesis.

A los compañeros, colegas y amigos de la facu a lo largo de estos 12 años. Al “mentor” Manu, a Nahue, Pablo y Giuli.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, por permitirme desarrollar la carrera de Doctorado y al CONICET por otorgarme la beca que posibilitó llevarlo a cabo.

A “los vagos”, mis amigos de toda la vida: Agu, Gordo K., Mike, Enano, Franco, Nacho C., Jona y Gusta. Mención especial para Nacho S., mi hermano, quien me conoce y entiende más que nadie y con quien llevo una amistad desde los 5 años. A Martina, mi gran amiga que me dio la escuela.

A mis amigos de Vóley, por las juntadas. Quiero agradecer especialmente a Nahuel, con quien no pierdo la oportunidad de juntarme cada vez que viene a Santa Fe, también a Vale y Pipa, con quienes cumplí el sueño de ver en vivo a John Frusciante tocando con los Red Hot.

A Blas, que me dio herramientas y consejos sumamente importantes que al día de hoy sigo aplicando. A Cristian, por su ayuda desinteresada y las sugerencias sumamente útiles. A Lu, la “*teacher*” de inglés, que con su alegría y humor pude mejorar muchísimo mi manejo del idioma, fundamental para la escritura del paper.

A la Pri, quien conocí en la última etapa del doctorado, por su amor, cariño, apoyo y acompañamiento de todos los días. También por enseñarme sobre salud humana, y por alguna que otra consulta médica...

Por último, a More, mi gran compañera, te llevo para siempre en mi corazón.

A todos ellos, y a los que no mencioné, muchísimas gracias.

APORTES CIENTÍFICOS-TECNOLÓGICOS

“Host Cell Impact on Pharmacokinetics and Neurobiological Activity of Non-Erythropoietic Hyperglycosylated EPO Variants”. Francisco Iturraspe, María de los Milagros Bürgi, Rocío Gutiérrez Fuster, Ricardo Kratje, Camila Scorticati, Marcos Oggero. J Pharm Sci. 2025 Sep;114(9):103901. Doi: 10.1016/j.xphs.2025.103901. Epub 2025 Jul 8

ÍNDICE

Abreviaturas, unidades y símbolos	10
Resumen	17
Summary	19
1. INTRODUCCIÓN	21
1.1. Expresión de proteínas recombinantes terapéuticas en células eucariotas	22
1.1.1. Bioterapéuticos	22
1.1.2. Glicosilación	23
1.1.2.1. N-glicosilación	24
1.1.2.2. O-glicosilación	25
1.1.3. Efecto de la glicosilación sobre las glicoproteínas	25
1.1.3.1. Farmacocinética	25
1.1.3.2. Estabilidad e integridad	26
1.1.3.3. Regulación de la adhesión celular	26
1.1.3.4. Transducción de señales y actividad biológica	26
1.1.3.5. Inmunogenicidad	27
1.1.4. Factores que afectan la glicosilación de las proteínas	28
1.1.5. Glicoingeniería	29
1.2. Enfermedades asociadas al sistema nervioso central	30
1.2.1. Enfermedades cerebrovasculares	30
1.2.2. Enfermedades neuroinflamatorias	31
1.2.3. Enfermedades neurodegenerativas	31
1.3. Eritropoyetina	33
1.3.1. Estructura de la EPO humana	33
1.3.2. Sitios de biosíntesis de hEPO	36
1.3.3. Receptores de hEPO	37
1.3.4. Actividad eritropoyética (AE)	38
1.3.5. Actividad neurobiológica (AN)	39
1.3.5.1. Actividad neuroprotectora	39
1.3.5.2. Actividad antioxidante	40
1.3.5.3. Actividad antiinflamatoria	40
1.3.5.4. Actividad neuroplástica y neurogénica	41
1.3.6. hEPO como candidato neuroterapéutico	42
1.3.6.1. Modificación química	42
1.3.6.2. Péptidos derivados de hEPO	43
1.3.6.3. Modificación del contenido de ácido siálico	44
1.4. Generación de mteínas hiperglicosiladas mediante glicoingeniería	44
2. OBJETIVOS	48

2.1. Objetivo general	49
2.2. Objetivos específicos	49
3. MATERIALES Y MÉTODOS	50
3.1. Reactivos y soluciones	51
3.2. Líneas celulares de mamíferos y cepas bacterianas	51
3.3. Cultivos primarios de neuronas de hipocampo	52
3.4. Medios de cultivo	53
3.4.1. Medios de cultivo para células eucariotas	53
3.4.2. Medios de cultivo para células procariotas	54
3.5. Sistemas de cultivo de células eucariotas	54
3.6. Determinación de la concentración de células viables, muertas y totales	55
3.7. Criopreservación de líneas celulares de mamífero	56
3.8. Revitalización de líneas celulares de mamífero	56
3.9. Técnicas de biología molecular	57
3.9.1. Maxipreparación de ADN plasmídico	57
3.9.2. Determinación de la concentración y pureza del ADN	58
3.9.3. Electroforesis en geles de agarosa	58
3.9.4. Digestiones enzimáticas	59
3.10. Desarrollo de líneas celulares recombinantes	59
3.10.1. Vectores plasmídicos utilizados	59
3.10.2. Generación de partículas lentivirales (PLV)	60
3.10.3. Transducción con PLVs	60
3.10.4. Selección de células recombinantes	61
3.10.5. Evaluación de la productividad celular	61
3.11. Producción de proteínas recombinantes	62
3.11.1. Producción de las variantes hiperglicosiladas de hEPO	62
3.11.2. Producción del mAb 2B2	62
3.12. Cuantificación de las variantes hiperglicosiladas de hEPO mediante ES	63
3.12.1. ES indirecto	63
3.12.2. ES indirecto amplificado	64
3.13. Purificación de las variantes hiperglicosiladas mediante cromatografía de inmunoafinidad (CIA)	65
3.13.1. Generación de las matrices de IA	65
3.13.1.1. Purificación del mAb 2B2	66
3.13.2. Selección de la solución eluyente adecuada para su empleo durante el proceso de la CIA. Evaluación de su capacidad eluyente	67
3.13.3. Protocolo de purificación de las muteínas derivadas de hEPO empleando la matriz de IA <i>Sepharose</i> -mAb 2B2	69
3.13.4. Concentración y diafiltración de las variantes hiperglicosiladas de hEPO	70

3.14. Caracterización fisicoquímica	71
3.14.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida con el agregado de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)	71
3.14.2. <i>Western blot</i>	72
3.14.3. Isoelectroenfoque (IEF)	73
3.14.4. Análisis de la estabilidad térmica	73
3.15. Estudio de la glicosilación	74
3.15.1. Análisis de macroheterogeneidad	74
3.15.2. Cuantificación de ácido siálico	74
3.16. Evaluación <i>in vitro</i> de actividad biológica	75
3.16.1. Evaluación de la actividad eritropoyética	75
3.16.2. Evaluación de la actividad neurobiológica	76
3.16.2.1. Evaluación de la neuritogénesis	77
3.16.2.2. Evaluación de la formación de filopodios	78
3.16.2.3. Evaluación de la formación de sinapsis	78
3.16.2.4. Inmunocitoquímica y análisis de la neuroplasticidad	79
3.17. Evaluación <i>in vivo</i> de las propiedades biológicas de rhEPO y de sus variantes	81
3.17.1. Evaluación farmacocinética	81
3.17.2. Evaluación de la actividad neuroplástica <i>in vivo</i>	84
3.18. Análisis estadístico	86
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	88
4.1. Producción, purificación, caracterización fisicoquímica y biológica <i>in vitro</i> de variantes expresadas en células CHO	90
4.1.1. Producción de las variantes hiperglicosiladas de hEPO	90
4.1.2. Purificación de las variantes hiperglicosiladas de hEPO por CIA	91
4.1.2.1. Evaluación de la capacidad eluyente de distintas soluciones	91
4.1.2.2. Generación de matrices de IA	92
4.1.3. Purificación de las variantes de hEPO empleando la matriz de IA Sepharose-mAb 2B2	94
4.1.4. Caracterización fisicoquímica	97
4.1.4.1. Evaluación de las MM aparentes	97
4.1.4.2. Análisis de la estabilidad térmica	98
4.1.5. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad biológica	102
4.1.5.1. Evaluación de la actividad eritropoyética	102
4.1.5.2. Evaluación de la actividad neuroplástica	103
4.2. Generación, producción, purificación, caracterización fisicoquímica y biológica <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de variantes expresadas en células HEK. Comparación con sus análogos expresados en células CHO	106
4.2.1. Desarrollo de líneas celulares recombinantes	106

4.2.2. Producción de las variantes hiperglicosiladas de hEPO en células HEK	109
4.2.3. Purificación de las variantes hiperglicosiladas de hEPO por CIA	110
4.2.4. Caracterización fisicoquímica	113
4.2.4.1. Análisis de los perfiles de MM	113
4.2.4.2. Análisis de los perfiles de glicoisofomas mediante IEF	113
4.2.4.3. Análisis de macroheterogeneidad	115
4.2.4.4. Cuantificación de ácido siálico	116
4.2.4.5. Análisis de la estabilidad térmica	119
4.2.5. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad biológica	120
4.2.5.1. Evaluación de la actividad eritropoyética	120
4.2.5.2. Evaluación de la actividad neuroplástica	121
4.2.5.2.1. Evaluación de la neuritogénesis	121
4.2.5.2.2. Evaluación de la formación de filopodios	123
4.2.5.2.3. Evaluación de la formación de sinapsis	124
4.2.6. Evaluación de las propiedades biológicas <i>in vivo</i>	126
4.2.6.1. Propiedades farmacocinéticas	126
4.2.6.2. Evaluación de la AN <i>in vivo</i>	129
5. CONCLUSIONES	134
6. ANEXO	139
7. BIBLIOGRAFÍA	147

Abreviaturas, unidades y símbolos

Abreviaturas y símbolos

(EpoR/ β cR)	Receptor heterodimérico de EPO
(EPOR ₂)	Receptor homodimérico de EPO
ACV	Accidente cerebrovascular
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADN _c	ADN copia
AE	Actividad eritropoyética
AEE	Actividad eritropoyética específica
Akt	Proteína quinasa B
AN	Actividad neurobiológica
ANOVA	Análisis de la varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ARN _m	ARN mensajero
AS	Ácido siálico
ATCC	Colección americana de cultivos – <i>American Type Culture Collection</i>
AUC	Área bajo la curva – <i>Area under the curve</i>
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro – <i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>
BHE	Barrera hematoencefálica
BHK	Riñón de hámster recién nacido – <i>Baby Hamster Kidney</i>
BSA	Albúmina sérica bovina – <i>Bovine Serum Albumin</i>
Cél	Célula
CEPO	EPO carbamilada
CHO	Ovario de hámster chino – <i>Chinese Hamster Ovary</i>
CIA	Cromatografía de inmutofinidad
Cl	Velocidad de depuración plasmática – <i>Clearance</i>
CMAH	Hidroxilasa del ácido N-acetilneuramínico activado con monofosfato de citidina – <i>Cytidine Monophosphate-N-Acetylneuraminic Acid Hydroxylase</i>
C _{máx}	Concentración plasmática máxima
Col.	Colaboradores
Cp	Concentración plasmática

ABREVIATURAS, UNIDADES Y SÍMBOLOS

CTP	Péptido C-terminal derivado de la gonadotropina coriónica humana – <i>C-Terminal Peptide</i>
D _B	Masa de fármaco en el cuerpo
DC	Dicroísmo circular
D _E	Masa de fármaco eliminado
D _{GI}	Masa de fármaco en el tracto gastrointestinal
DIV	Días <i>in vitro</i>
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco – <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSZ	Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares – <i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH</i>
DO	Densidad óptica
Dol-P	Dolicol-fosfato
E	Fracción de elución
Ec	Ecuación
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Enzimoimmunoensayo por adsorción - <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EMA	Agencia Europea de Medicamentos – <i>European Medicines Agency</i>
EPO	Eritropoyetina
EPOR	Monómero del receptor de EPO
ES	ELISA Sándwich
F	Fracción de fármaco absorbida
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos – <i>Food and Drug Administration</i>
FSH	Hormona folículo estimulante – <i>Follicle-Stimulating Hormone</i>
Fuc	Fucosa
Gal	Galactosa
GalNAc	N-acetilgalactosamina
GALT	Galactosiltransferasa
GI	Gastrointestinal
Glc	Glucosa
GPI	Glicofosfatidilinositol

ABREVIATURAS, UNIDADES Y SÍMBOLOS

HEK	Riñón embrionario humano – <i>Human Embryonic Kidney</i>
hEPO	Eritropoyetina humana
hGM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humano – <i>human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
HIF	Factor inducible por hipoxia – <i>Hypoxia-Inducible Factor</i>
HPAEC-PAD	Cromatografía de intercambio aniónico a pH elevado con detección amperométrica pulsada – <i>High-pH Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection</i>
Hyb	Hibridoma – <i>Hybridoma</i>
IA	Inmunoafinidad
IEF	Isoelectroenfoque
IFN- β	Interferón beta
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
IMDM	Medio de Dulbecco modificado de Iscove – <i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i>
ip	Intraperitoneal
JAK	Quinasa Janus
K _a	Constante de absorción
K _e	Constante de eliminación
mAb	Anticuerpo monoclonal – <i>monoclonal Antibody</i>
MAPK	Quinasa de proteínas activada por mitógenos – <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
Man	Manosa
MM	Masa molecular
MMM	Marcador de masa molecular
MR	Masa de la proteína de interés
MT	Masa total sembrada
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium
Mut	Muteína
N/D	No determinado
N2a	Neuro-2a

ABREVIATURAS, UNIDADES Y SÍMBOLOS

NB	Neurobasal
Neu5Ac	Ácido N-acetilneuramínico
Neu5Gc	Ácido N-glicolilneuramínico
NF-Kb	Factor Nuclear kappa-potenciador de cadenas ligeras de células B activadas – <i>Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NMDA-R1	Marcador postsináptico Receptor N-metil-D-aspartato subunidad 1
OPD	<i>o</i> -Fenilendiamina
OST	Oligosacariltransferasa
pAb	Anticuerpo policlonal – <i>policlonal Antibody</i>
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida – <i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBS	Solución salina de fosfatos – <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa – <i>polymerase chain reaction</i>
pI	Punto isoeléctrico
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa – <i>Phosphatidylinositol 3-Kinase</i>
PK	Farmacocinética/farmacocinéticos - <i>pharmacokinetics</i>
PLV	Partículas lentivirales
PMS	Metasulfato de fenazina
R	Recuperación
Ras	Proteína Ras
RE	Retículo endoplasmático
rhEPO	Eritropoyetina humana recombinante
rhGM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humano recombinante – <i>recombinant human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
rhIFN- α 2b	Interferón alfa-2b humano recombinante
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROS	Especies reactivas del oxígeno – <i>Reactive Oxygen Species</i>
SD	Desviación estándar – <i>Standard Deviation</i>
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SEM	Desviación estándar de la media – <i>Standard Error of the Mean</i>
SFB	Suero fetal bovino
SN	Sobrenadante

ABREVIATURAS, UNIDADES Y SÍMBOLOS

SNC	Sistema nervioso central
SOD	Superóxido dismutasa – <i>Superoxide Dismutase</i>
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción – <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
Syn	Sinaptofisina
t	Tiempo
$t_{1/2}$	Tiempo de vida media
TA	Temperatura ambiente
TBS	solución salina tamponada con Tris – <i>Tris-Buffered Saline</i>
T_M	Temperatura de fusión – <i>Melting temperature</i>
$T_{m\acute{a}x}$	Tiempo para alcanzar la $C_{m\acute{a}x}$
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa – <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
TS	<i>Thermal Shift</i>
VC	Volumen de columna
V_D	Volumen de distribución aparente
X_M	Células muertas
X_T	Células totales
X_V	Células viables

Unidades

cm	centímetro
mm	milímetro
μm	micrómetro
nm	nanómetro
cm^2	centímetro cuadrado
kg	kilogramo
g	gramo
mg	miligramo
μg	microgramo
ng	nanogramo
pg	picogramo
L	litro
mL	mililitro

ABREVIATURAS, UNIDADES Y SÍMBOLOS

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	constante de aceleración de la gravedad
mA	miliamperio
V	voltio
(V/V)	proporción volumen:volumen
W	vatio
% (V/V)	mililitros de solvente en 100 mL de solución
% (P/V)	gramos de soluto en 100 mL de solución
M Ω	mega-ohmio
$^{\circ}\text{C}$	grado Celsius
ϵ	Coefficiente de extinción molar
λ	longitud de onda
pb	pares de bases
nC	nanocoulomb

Código de una y tres letras para aminoácidos

Alanina	A	Ala
Arginina	R	Arg
Asparagina	N	Asn
Ácido Aspártico	D	Asp
Cisteína	C	Cys
Fenilalanina	F	Phe
Glicina	G	Gly
Ácido 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

Resumen

La eritropoyetina humana (hEPO) es una glicoproteína que actúa como uno de los principales reguladores de la masa de glóbulos rojos en sangre. Su uso como biofármaco en el tratamiento de diversos tipos de anemia ha demostrado ser seguro y eficaz.

En los últimos años, se ha identificado la expresión de hEPO y su receptor en el sistema nervioso central (SNC), en donde desempeña funciones citoprotectoras y neuroplásticas. Este hecho ha despertado interés por desarrollar nuevas alternativas terapéuticas para enfermedades asociadas al SNC, muchas de las cuales carecen actualmente de tratamientos efectivos. Si bien la hEPO ha demostrado efectos promisorios para este tipo de patologías, su uso como agente neuroterapéutico se ve limitado por los efectos adversos derivados de su actividad hematopoyética, tales como fenómenos protrombóticos, hipertensión arterial y policitemia, especialmente en contextos que requieren de su administración crónica.

Con el objetivo de priorizar selectivamente las propiedades neurobiológicas de hEPO sin los efectos asociados a su actividad eritropoyética, previamente en nuestro laboratorio se diseñaron 12 muteínas de hEPO, mediante estrategias de glicoingeniería por hiperglicosilación, las que fueron expresadas en células CHO.K1. Estas variantes presentan la modificación de uno o dos aminoácidos en distintas regiones de la secuencia de hEPO, con el propósito de incorporar un sitio adicional de N-glicosilación que permita bloquear su actividad eritropoyética, preservando al mismo tiempo su función neurobiológica. De las muteínas, 3 de ellas (Mut 45_47, Mut 104 y Mut 151_153) fueron previamente caracterizadas en profundidad, obteniéndose resultados muy promisorios. Estos hallazgos constituyen el fundamento para la continuación de dicho estudio, orientado a la evaluación funcional de las nueve muteínas restantes. Estas fueron producidas, purificadas y caracterizadas mediante el estudio de sus propiedades fisicoquímicas y su función biológica *in vitro*.

En una etapa posterior y, considerando las propiedades del conjunto de muteínas inicialmente diseñadas, las variantes con las mejores características (Mut 45_47 y Mut 104) fueron expresadas en la línea celular HEK-293. El objetivo se centró en obtener muteínas con un perfil de glicosilación similar a la hEPO producida fisiológicamente en el SNC y comparar variantes expresadas en los distintos huéspedes celulares en términos de su función biológica *in vitro* e *in vivo*.

Las líneas celulares recombinantes HEK-293 fueron generadas por transducción empleando partículas lentivirales. A partir de ellas, se realizó la producción de cada variante en condiciones de adherencia y su purificación por cromatografía de inmunoafinidad (IA), lo que le confirió elevados valores de pureza en un único paso.

El estudio de los perfiles de masas moleculares (MM) y las glicoisformas de las variantes expresadas en células HEK-293 demostró una menor MM aparente y un número reducido de isoformas ácidas en comparación con sus homólogas derivadas de CHO.K1, debido a modificaciones en la microheterogeneidad dada por una menor complejidad de sus estructuras de glicanos y a un contenido inferior de ácido siálico.

La caracterización biológica *in vitro* demostró el bloqueo de la actividad eritropoyética y la conservación de la actividad neurobiológica, evidenciada por la estimulación de la neuritogénesis, formación de filopodios y sinaptogénesis, de manera similar a la eritropoyetina humana recombinante (rhEPO).

Por último, la caracterización biológica *in vivo* fue realizada mediante el análisis de las propiedades farmacocinéticas en ratas y la actividad neurobiológica en ratones. Los estudios farmacocinéticos demostraron una mayor depuración plasmática y una menor vida media en las variantes producidas en células HEK-293, probablemente como consecuencia de una mayor eliminación renal y/o hepática. No obstante, estas muteínas exhibieron un volumen de distribución superior, lo que estaría relacionado con la salida de estas del sistema circulatorio y su acumulación en tejidos periféricos, dentro de los que se encuentra el SNC. A pesar de las propiedades farmacocinéticas menos favorables, no se observaron diferencias significativas entre líneas celulares con relación a la actividad neurobiológica *in vivo*, evidenciado por el efecto neuroplástico sobre las neuronas piramidales de hipocampo. Adicionalmente, todas las muteínas demostraron una capacidad de morfogénesis neuronal con mayor eficacia y complejidad que la molécula de rhEPO original.

Los resultados obtenidos en la presente tesis perfilan a la línea celular HEK-293 como una plataforma de producción prometedora para análogos de hEPO con potencial terapéutico en patologías del SNC, al ofrecer un perfil de glicosilación más favorable, con glicanos más simples y menos inmunogénicos.

Summary

Human erythropoietin (hEPO) is a glycoprotein that acts as one of the main regulators of red blood cell mass in the blood. Its use as a biopharmaceutical in the treatment of various types of anemia has proven to be safe and effective.

In recent years, the expression of hEPO and its receptor has been identified in the central nervous system (CNS), where it exerts cytoprotective and neuroplastic functions. This finding has sparked considerable interest in developing new therapeutic alternatives for CNS-associated diseases, many of which currently lack effective treatments. Although hEPO has shown promising effects for these pathological contexts, its use as a neurotherapeutic agent is limited by adverse effects derived from its erythropoietic activity, such as prothrombotic events, arterial hypertension, and polycythemia—particularly in scenarios requiring chronic administration.

Aiming to selectively prioritize the neurobiological properties of hEPO while minimizing the effects associated with its erythropoietic activity, 12 hEPO muteins were previously designed in our laboratory using glycoengineering strategies through hyperglycosylation, which were expressed in CHO.K1 cells. These variants present the modification of one or two amino acids in different regions of the hEPO sequence, with the purpose of incorporating an additional N-glycosylation site to block its erythropoietic activity while preserving its neurobiological function. Three of these muteins (Mut 45_47, Mut 104, and Mut 151_153) were previously characterized in detail, yielding very promising results. These findings provided the foundation for the continuation of this work, focused on the functional evaluation of the remaining 9 muteins. These were produced, purified, and characterized by studying their physicochemical properties and *in vitro* biological activity.

In a subsequent stage, and considering the properties of the initially designed set of muteins, the variants with the most favorable characteristics (Mut 45_47 and Mut 104) were expressed in the HEK-293 cell line. The objective was focused on obtaining muteins with a glycosylation profile similar to the hEPO physiologically-produced in the CNS, and to compare variants expressed in different host cells in terms of their *in vitro* and *in vivo* biological properties.

The recombinant HEK-293 cell lines were generated by transduction using lentiviral particles. The production of each variant was carried out under adherence conditions and their purification by immunoaffinity chromatography, which conferred high purity values in a single step. Analysis of the molecular mass (MM) profiles and glycoisoforms of the variants

SUMMARY

expressed in HEK-293 cells demonstrated a lower apparent MM and a reduced number of acidic isoforms compared to their CHO.K1-derived counterparts. These differences were attributed to modifications in microheterogeneity, given by a lower complexity of their glycan structures and lower sialic acid content.

The *in vitro* biological characterization confirmed the blockade of erythropoietic activity and the preservation of neurobiological function, evidenced by the stimulation of neuritogenesis, filopodia formation, and synaptogenesis, similar to recombinant human erythropoietin (rhEPO).

Finally, the *in vivo* characterization was carried out by analyzing the pharmacokinetic properties in rats and the neurobiological activity in mice. Pharmacokinetic studies demonstrated increased plasma clearance and a shorter half-life in the variants produced in HEK-293 cells, likely due to enhanced renal and/or hepatic elimination. Nevertheless, these muteins exhibited a higher volume of distribution, which may be associated with their exit from the circulatory system and the accumulation in peripheral tissues, including the CNS. Despite their less favorable pharmacokinetic profiles, no significant differences were observed between cell lines concerning *in vivo* neurobiological activity, evidenced by the neuroplastic effects on hippocampal pyramidal neurons. Additionally, all muteins demonstrated a capacity for neuronal morphogenesis with greater efficacy and complexity than the original rhEPO molecule.

The results obtained in this thesis highlight the HEK-293 cell line as a promising production platform for hEPO analogs with therapeutic potential in CNS-associated pathologies, offering a more favorable glycosylation profile characterized by simpler and less immunogenic glycans.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Expresión de proteínas recombinantes terapéuticas en células eucariotas

1.1.1. Bioterapéuticos

Los bioterapéuticos, también llamados biofarmacéuticos, drogas biológicas, agentes biológicos o simplemente biológicos, son entidades de elevada MM (superior a 1000 Da) producidos por sistemas vivos. Existen diferentes clasificaciones, pero en general involucran un grupo de proteínas o sustancias farmacéuticas empleadas con fines terapéuticos o de diagnóstico *in vivo*. Su obtención puede incluir la extracción directa a partir de una fuente biológica nativa, o ser producidos de manera recombinante, a partir de una célula genéticamente modificada. Estos últimos, desde el punto de vista de su complejidad, pueden clasificarse en biofármacos de primera, segunda y tercera generación. Los de primera generación incluye a los biofármacos de simple reemplazo que comprenden proteínas recombinantes, cuyo objetivo terapéutico implica sustituir una función deficiente incorporando aquella proteína que no es producida por el ser humano o que lo hace en forma deficitaria. También involucra a los anticuerpos monoclonales en sus primeras versiones. En cuanto a los de segunda generación, estos involucran proteínas recombinantes de primera generación a las que se realizó alguna modificación con el objetivo de mejorar algunas de sus propiedades tales como estabilidad, farmacocinética, especificidad, farmacodinamia, entre otras. Finalmente, los de tercera generación abarcan productos basados en ácidos nucleicos y células genéticamente modificadas [1,2].

Las células eucariotas derivadas de mamíferos (eucariotas superiores) constituyen la plataforma de elección para el desarrollo y producción de biofármacos aplicados en salud humana. Esto es debido fundamentalmente a que la mayoría de tales proteínas requieren modificaciones postraduccionales, como la glicosilación, que las células procariontes o eucariotas inferiores no pueden realizar o lo hacen de una forma diferente. Adicionalmente, utilizar células de mamífero permite que las proteínas sean secretadas hacia el medio extracelular, lo que evita su degradación intracelular por proteólisis y facilita el proceso de obtención de las mismas, incrementando su recuperación [3].

Las líneas celulares derivadas de mamíferos más utilizadas en la industria farmacéutica para la producción de biofármacos son las células CHO.K1, derivadas de ovario de hámster chino (del inglés *Chinese Hamster Ovary*); células BHK, derivadas de riñón de hámster recién nacido (del inglés, *Baby Hamster Kidney*) y células derivadas de mielomas murinos NS0 y Sp2/0. Adicionalmente, las líneas celulares derivadas de células humanas tales como las células HEK-293, derivadas de riñón embrionario humano (del inglés *Human Embryonic*

Kidney) y HT-100, derivadas de mioblastos humanos, también son empleadas para el desarrollo de proteínas y vectores virales aplicados en salud humana [4].

Las células CHO.K1 representan aproximadamente el 70% de los biofármacos aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) en EEUU y la *European Medicines Agency* (EMA) en Europa. Sin embargo, las líneas celulares humanas, están ganando relevancia fundamentalmente por su capacidad para producir proteínas con modificaciones postraduccionales humanas, disminuyendo la inmunogenicidad, característica demostrada en líneas celulares de mamíferos no humanos. La línea celular HEK-293 es la más importante por la versatilidad en su uso, ya que puede ser empleada con alta eficiencia tanto para la producción de vectores virales como para la expresión transitoria y/o estable de proteínas recombinantes (facilidad de transfección). Adicionalmente, su alta eficiencia de transfección y la compatibilidad con sistemas de expresión transitoria permiten una obtención rápida de la proteína de interés, característica que resulta especialmente valiosa en etapas tempranas del desarrollo de biofármacos [5].

Actualmente, las células HEK-293 se emplean a escala comercial en múltiples terapias aprobadas. Entre los productos aprobados por la FDA o la EMA para terapia génica se destacan Luxturna® (Spark Therapeutics), Zolgensma® (Novartis) y Upstaza™ (PTC Therapeutics) [6,7]. Esto refleja su creciente aceptación regulatoria y su escalabilidad para la manufactura. Asimismo, diversos bioterapéuticos basados en proteínas recombinantes producidas en esta línea celular han sido aprobados para su administración, dentro de los que se destacan Alprolix® (Sanofi), Elocate® (Sanofi), NUWIQ® (Octapharma) y Trulicity® (Eli Lilly and Company) [8].

1.1.2. Glicosilación

La glicosilación de proteínas es el evento co/postraducciona l más importante realizado por las células eucariotas, ya que se conoce que más del 50% de las proteínas humanas se encuentran glicosiladas [9]. Este proceso consiste en la unión covalente de cadenas de oligosacáridos a través del grupo amida de un residuo del aminoácido Asn (unión de tipo N) o al grupo hidroxilo de un residuo de Thr o Ser (unión de tipo O) y es llevado a cabo en el retículo endoplasmático (RE) y en el complejo de Golgi, por un gran número de enzimas glicosidasas y glicosiltransferasas. Si bien las uniones mencionadas son predominantes, existen otros tipos de glicosilaciones menos frecuentes como la unión al carbono 2 de un residuo de Trp (unión de tipo C), la unión de un pequeño glicano de GlcNAc y 3 Man a etanolamina e inositol, y éste a su vez, a dos cadenas de ácidos grasos para dar lugar al

anclaje GPI (glicofosfatidilinositol) que permite unir proteínas a la superficie de membranas de determinadas células [10].

Las proteínas N- y O- glicosiladas pueden presentar heterogeneidad tanto en el número de sitios que se encuentran efectivamente glicosilados u ocupados (macroheterogeneidad), como en la estructura de los glicanos que ocupan un mismo sitio (microheterogeneidad), generando así una multiplicidad de glicoisoformas de una misma proteína [11]. La macroheterogeneidad hace referencia a la diversidad producto de la transferencia subestequiométrica de glicanos mientras que la microheterogeneidad refiere a la diversidad resultante del procesamiento subestequiométrico de los mismos [12].

La participación de los glicanos en procesos tales como señalización e interacción entre células, proliferación celular, actividad biológica y estabilidad de proteínas, interacción de proteínas con sus receptores, desarrollo de tumores y metástasis, respuesta inmune, anticoagulación, entre otros, revelan la importancia de la glicosilación en diversos procesos celulares [13].

1.1.2.1. N-glicosilación

La N-glicosilación es el tipo de glicosilación más estudiado. Esta modificación consiste en la unión covalente de una cadena de oligosacáridos al grupo amida de un residuo Asn de una cadena polipeptídica naciente que se encuentre formando parte de la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr, siendo X cualquier aminoácido excepto Pro.

La síntesis de los N-glicanos se inicia en el RE a través de la transferencia de un precursor compuesto de dolicol fosfato (Dol-P) unido a un oligosacárido de 14 unidades de azúcares ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNac}_2$). Luego de ser transferido, se llevan a cabo modificaciones en el lumen del RE y las cisternas del complejo de Golgi, mediante la acción de enzimas glucosidasas, manosidasas y transferasas, dando como resultado a las estructuras descritas ampliamente en la bibliografía. Los N-glicanos presentes en las glicoproteínas humanas comparten la misma estructura base o *core*, que consiste en un pentasacárido ($\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3$), pero se diferencian en sus ramificaciones. Existen 3 tipos de estructuras: 1) alta manosa, la cual posee solo residuos de manosa unidos; 2) complejo, que contiene ramificaciones conteniendo residuos de N-acetilglucosamina, galactosa y ácido siálico; 3) híbrido, que comparte características de los 2 tipos de estructuras anteriores [14,15].

1.1.2.2. O-glicosilación

La O-glicosilación es otro tipo muy común de modificación postraduccional que consiste en la adición de cadenas de azúcares al grupo hidroxilo de una Ser o Thr. A diferencia de la N-glicosilación, no se ha descrito una secuencia consenso que permita predecir la ocurrencia de este evento. Sin embargo, se ha observado que se encuentra favorecido en regiones de la proteína con altos contenidos de Pro, Ser y Thr, siendo este último el aminoácido con mayor probabilidad de ser glicosilado. Además, las estructuras de los O-glicanos contienen menor número de residuos y complejidad.

Este proceso se realiza en el complejo de Golgi mediante la acción de enzimas transferasas que realizan la adición de distintos monosacáridos que determinan las diferentes estructuras básicas posibles de O-glicanos. En células de mamíferos y humanas, las estructuras más comunes son el *core 1*, compuesto por la GalNAc inicial y un residuo de galactosa (Gal β -3GalNAc), y el *core 2*, compuesto por GalNAc, un residuo de Gal y uno de GlcNAc (Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc) [16].

1.1.3. Efecto de la glicosilación sobre las glicoproteínas

Si bien la función que posee una proteína se encuentra principalmente determinada por la secuencia aminoacídica que la compone, los glicanos juegan un rol crítico, confiriendo propiedades biológicas o mejorando aquellas preexistentes [17]. A continuación, se mencionan algunas propiedades y procesos en los que participan los glicanos.

1.1.3.1. Farmacocinética

La farmacocinética es la rama de la farmacología encargada de estudiar los procesos que un fármaco experimenta dentro del organismo desde su administración hasta su eliminación. Este estudio se estructura a través del modelo LADME, que representa las cinco etapas fundamentales que ocurren desde la administración de una droga: Liberación, Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción [18]. Estos procesos determinan la concentración del fármaco en la sangre y en los tejidos a lo largo del tiempo. Por este motivo, los parámetros farmacocinéticos más comúnmente calculados son: el tiempo de vida media ($t_{1/2}$), el *clearance* o velocidad de depuración plasmática (Cl), el área bajo la curva (AUC, del inglés *Area Under the Curve*), la concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$) y el tiempo requerido para alcanzarla ($T_{m\acute{a}x}$).

En general, la presencia de glicanos produce una mejora en estos parámetros ya que contribuyen a aumentar el tamaño de la glicoproteína (a través del incremento del radio

hidrodinámico), su MM y su carga. El aumento del tamaño y la repulsión electrostática que se establece entre las cargas aportadas por las moléculas de ácido siálico (AS) de los glicanos y la carga de la membrana basal del glomérulo renal provoca la disminución de su eliminación por impedimentos al proceso de filtración para la formación de la orina. Este mecanismo de eliminación es especialmente importante para proteínas menores de 70 kDa [19]. Asimismo, la presencia de las moléculas de AS reduce la eliminación hepática de las glicoproteínas debido a que le confieren la capacidad de evadir los receptores de asialoglicoproteínas, al enmascarar los residuos de Gal o GalNAc, impidiendo la endocitosis mediada por receptores a nivel de hepatocitos. Adicionalmente, también existen receptores de Man que permiten depurar proteínas con alto contenido de este residuo, así como receptores de tipo GlcNAc como monosacárido terminal [11,20,21].

1.1.3.2. Estabilidad e integridad

Los glicanos contribuyen a aumentar la estabilidad e integridad de las glicoproteínas. Estos aumentan la resistencia a la desnaturalización térmica, inhiben la agregación proteica y mejoran la solubilidad por su hidrofiliidad y capacidad para enmascarar residuos hidrofóbicos cuando la proteína se encuentra en medio acuoso [22]. Además, los glicanos permiten ocultar sitios de clivaje de enzimas proteolíticas presentes en circulación, lo que favorece su integridad [23].

1.1.3.3. Regulación de la adhesión celular

La glicosilación participa en la regulación de la adhesión celular, afectando la estructura y la función de diversas moléculas de adhesión, como las caderinas, selectinas e integrinas. En las caderinas, la glicosilación (tanto O- como N-glicosilación) modula su localización en la membrana y su capacidad para formar uniones adherentes estables. En las selectinas, la presencia de estructuras glicosiladas específicas permite la interacción con otras células, mediando procesos como la migración leucocitaria y la implantación embrionaria. Por su parte, las integrinas, que vinculan las células con la matriz extracelular, muestran alteraciones en su glicosilación durante estados patológicos como el cáncer, lo que impacta en su señalización intracelular y adhesión [24].

1.1.3.4. Transducción de señales y actividad biológica

La glicosilación de proteínas de superficie celular participa en la modulación de la transducción de señales, que resulta crítica en contextos donde se requiere una interacción específica y precisa entre el ligando y el receptor. Los glicanos presentes en estas proteínas

no solo estabilizan la conformación tridimensional necesaria para el reconocimiento receptor-ligando, sino que también pueden aumentar la afinidad y especificidad de dicha interacción. Además, ciertos patrones de glicosilación actúan como códigos moleculares que determinan la accesibilidad y funcionalidad de los dominios de unión, afectando la intensidad y duración de la señal transmitida [25].

Adicionalmente, la mejora en la farmacocinética previamente mencionada deriva en un aumento en la actividad biológica de la glicoproteína como consecuencia del incremento en el tiempo de su circulación plasmática y la disponibilidad para interactuar con su receptor.

1.1.3.5. Inmunogenicidad

La presencia de glicanos tiene un efecto dual sobre esta propiedad. Por un lado, las cadenas de oligosacárido disminuyen el procesamiento y presentación antigénica debido al enmascaramiento de epítopes proteicos [26], lo cual constituiría un efecto deseable en glicoproteínas utilizadas como bioterapéuticos en salud humana. Por otro lado, se ha descrito que la glicosilación es capaz de estimular la respuesta inmune, generándose anticuerpos anti-glicano, lo que constituye un aspecto indeseado.

Por su parte, al utilizar huéspedes celulares de origen no humano, como es el caso de la línea celular CHO.K1, como sistema de expresión de glicoproteínas terapéuticas, estas son capaces de introducir determinantes antigénicos que incrementan la inmunogenicidad de dichos productos. Específicamente, estas células son capaces de catalizar la conversión del residuo N-acetilneuramínico (Neu5Ac) en ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc), una variante de AS con potencial inmunogénico que no es sintetizado por el ser humano debido a una mutación en el gen CMAH (por su sigla en inglés, *cytidine monophosphate-N-acetylneuraminic acid hydroxylase*) [27]. Sin embargo, este puede ser incorporado a través de la dieta en una pequeña proporción, y distintos reportes han detectado anticuerpos circulantes anti-Neu5Gc [28,29]. De este modo, la presencia de Neu5Gc en glicoproteínas terapéuticas puede desencadenar una respuesta inmune mediada por la generación de dichos anticuerpos, lo que representa un riesgo en términos de seguridad para los pacientes tratados con tales bioterapéuticos, especialmente cuando su administración es crónica. Asimismo, otro determinante antigénico relevante producido por células CHO.K1 es el disacárido galactosa- α -1,3-galactosa (Gal α 1-3Gal o residuo α -Gal), que tampoco se encuentra presente en humanos y es altamente inmunogénico. La exposición a estos epítopes glicosídicos no humanos se asocia con la generación de una respuesta inmune indeseada, aspecto que puede comprometer la eficacia terapéutica del

biofármaco, al provocar efectos adversos en los tratamientos [30]. Por este motivo, la selección del sistema de expresión, así como la caracterización y monitoreo de este tipo de epitopes constituyen aspectos críticos en la generación de glicoproteínas terapéuticas.

1.1.4. Factores que afectan la glicosilación de las proteínas

Los patrones de glicosilación se ven modificados tanto por factores internos como externos. Los factores internos están relacionados con la maquinaria enzimática de la célula hospedadora. Si bien existen diversos sistemas de expresión tales como células procariontas, eucariotas inferiores (protozoos y algas) y eucariotas superiores (hongos, plantas y animales), la mayoría de los biofármacos aprobados en la actualidad son glicoproteínas complejas que requieren un perfil apropiado de glicosilación, motivo por el cual se eligen las células de mamífero, dado que son las únicas que realizan modificaciones postraduccionales compatibles con el ser humano.

De este modo, los glicanos producidos por las células de mamífero distan de los producidos por levaduras, plantas y células de insectos. Las primeras generan estructuras de oligosacáridos hipermanosilados, las segundas adicionan residuos de xilosa y fucosa en posiciones específicas que son altamente inmunogénicas y los insectos agregan glicanos más simples como paucimanosa. En los tres casos ninguno agrega residuos de ácido siálico. En cuanto a los factores externos, los mismos están relacionados con la composición del medio de cultivo y el modo en que las células son cultivadas. Por tal motivo, es posible modificarlos con el objetivo de favorecer determinadas características en los perfiles de glicosilación. Teniendo en cuenta la composición del medio de cultivo, la disponibilidad de azúcares precursores como glucosa, galactosa y manosa, favorecen la extensión de las cadenas de glicanos, mientras que la administración de glutamina como fuente de energía y precursora de la síntesis de nucleótidos conduce a la acumulación de amonio en el medio de cultivo, disminuyendo la incorporación de ácido siálico terminal. La suplementación de medios con suero fetal bovino produce un efecto similar, donde si bien tiene un efecto sumamente positivo sobre la proliferación celular, la variabilidad entre lotes o marcas puede traducirse en una mayor heterogeneidad de los glicanos.

Considerando el modo de cultivo, la operación en perfusión ha demostrado obtener productos de mejor calidad y menor variabilidad. Esto se debe a que la administración continua de medio de cultivo fresco impide la acumulación de metabolitos de desecho que inhiben enzimas participantes del proceso de glicosilación, junto con un bajo tiempo de

residencia de la proteína de interés dentro del reactor, reduciendo la cantidad de enzimas proteolíticas y glicolíticas secretadas como producto de la lisis celular [31].

1.1.5. Glicoingeniería

La glicoingeniería constituye una serie de procedimientos de ingeniería molecular y celular que permiten modificar el contenido y/o la estructura de los glicanos en las proteínas. Esta es aplicada considerando los efectos positivos de la glicosilación sobre las proteínas terapéuticas, y tiene como objetivo principal generar una nueva entidad proteica con propiedades mejoradas respecto de la molécula original, tales como disminuir el *clearance* plasmático de la molécula como consecuencia de una reducción en su eliminación renal, modular la endocitosis mediada por receptores, reducir la antigenicidad, incrementar su actividad biológica y mejorar su estabilidad, entre otras [32]. De acuerdo con el tipo de glicosilación que involucra la modificación, las técnicas pueden clasificarse en N- y O-glicoingeniería. A modo de ejemplo, la mutagénesis sitio-dirigida para la generación de sitios consenso de N-glicosilación fue aplicada para el desarrollo de la darbepotetina alfa (comercializado bajo el nombre Aranesp® por parte de la empresa Amgen), un análogo de rhEPO que posee 5 sitios consenso de N-glicosilación en comparación a la proteína nativa que presenta 3, lo que permitió incrementar 3 veces el tiempo de vida media en circulación sanguínea [33]. Otro ejemplo de N-glicosilación de proteínas consistió en la investigación y desarrollo en nuestro laboratorio de una variante hiperglicosilada de interferón alfa-2b humano (rhIFN- α 2b) denominado IFN4N [34]. Esta variante fue generada mediante la introducción de mutaciones puntuales en la secuencia natural del rhIFN- α 2b que permitieron generar 4 sitios consenso de N-glicosilación, cuando la molécula original no cuenta con ninguno. Dicha modificación incrementó 25 veces en el tiempo de vida media y disminuyó 20 veces la velocidad de depuración plasmática, con respecto a la molécula no modificada.

Otra estrategia de glicoingeniería descrita consiste en la fusión de péptidos susceptibles de ser glicosilados, cuya ventaja radica en evitar la modificación de la estructura primaria de la molécula original. El abordaje de esta metodología permitió el desarrollo de una variante hiperglicosilada de la hormona folículo estimulante (FSH, del inglés *Follicle-Stimulating Hormone*) que contiene cuatro sitios adicionales de O-glicosilación, comercializado por la empresa Merck bajo el nombre de ELONVA®. En este caso, se realizó la fusión de la FSH al péptido C-terminal (CTP, del inglés *C-Terminal Peptide*) derivado de la subunidad β de la gonadotropina coriónica humana, que contiene 28 aminoácidos y cuenta con 4 sitios de

O-glicosilación natural. Esta modificación le confirió a la molécula una eficacia terapéutica superior respecto de la molécula original, incrementando la ovulación [35]. Basado en esta estrategia, en nuestro laboratorio se ha diseñado un péptido derivado del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humano (hGM-CSF, del inglés *human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*) más eficiente que el anteriormente nombrado CTP. Este péptido fue denominado mGMOP y está constituido por 15 aminoácidos y su secuencia está formada por los primeros 7 aminoácidos del extremo N-terminal del hGM-CSF junto con 8 residuos adicionales que incluyen 4 repeticiones de Pro y Thr, lo que permite generar un total de 6 sitios potenciales de O-glicosilación [36]. La fusión de repeticiones de mGMOP a las regiones terminales de proteínas de interés para uso veterinario y salud humana logró aumentar su MM, generando una mejora significativa en los perfiles farmacocinéticos, evidenciada por un incremento en su tiempo de vida media plasmática ($t_{1/2}$) y una disminución en su velocidad de depuración [37,38].

Estos antecedentes demuestran que la glicoingeniería de proteínas representa un conjunto de metodologías sumamente útiles que permiten mejorar las propiedades fisicoquímicas y biológicas de proteínas recombinantes de interés terapéutico, y el principal desafío para su aplicación radica en modificar el contenido de glicanos sin alterar la actividad biológica de la proteína nativa. Sin embargo, un desarrollo llevado a cabo en nuestro laboratorio que tiene directa correlación con este trabajo de tesis y que será posteriormente abordado, demostró la capacidad de la glicoingeniería para modificar la actividad biológica de hEPO (sección 1.4).

1.2. Enfermedades asociadas al sistema nervioso central

Las enfermedades asociadas al SNC constituyen un conjunto de patologías que provocan desórdenes cognitivos, alteraciones de conducta y cambios en la regulación del organismo. Las principales causas de la aparición de estas enfermedades son genéticas, las ocurrencias de infecciones, traumas, defectos estructurales, desórdenes regulatorios, neoplasias, accidentes cerebrovasculares (ACV) o el propio efecto del envejecimiento. Asimismo, este grupo de patologías puede dividirse en enfermedades neurodegenerativas, cerebrovasculares, inflamatorias, tumorales del SNC, entre otras.

1.2.1. Enfermedades cerebrovasculares

Las enfermedades cerebrovasculares comprenden un conjunto de trastornos que involucran el ACV isquémico y hemorrágico, las malformaciones vasculares, el deterioro

cognitivo y la demencia de origen vascular. Estas patologías constituyen una de las principales causas de muerte a nivel mundial [39]. En 2021, se registraron aproximadamente 7 millones de muertes por ACV a nivel mundial, lo que representa un aumento del 44% en comparación con 1990, posicionándose como la segunda causa de muerte en el mundo [40]. Dentro de los tratamientos disponibles para estas patologías, se encuentran la administración de fármacos antiplaquetarios y anticoagulantes, así como terapia física y psicológica para mejorar la recuperación funcional [41].

1.2.2. Enfermedades neuroinflamatorias

Las enfermedades neuroinflamatorias comprenden un grupo heterogéneo de trastornos caracterizados por una respuesta inflamatoria anormal o exacerbada del sistema inmunológico dentro del SNC. Esta inflamación puede estar mediada por células inmunitarias residentes como la microglía y los astrocitos, así como por células periféricas que atraviesan la barrera hematoencefálica (BHE). Pueden ser causadas por desórdenes autoinmunes, infecciones, procesos parainfecciosos y posinfecciosos como la encefalomiелitis aguda diseminada y por factores genéticos y ambientales que modulan la respuesta inmune en el SNC [42]. Dentro de este grupo, la patología más prevalente y estudiada es la esclerosis múltiple, una enfermedad autoinmune crónica y progresiva que afecta el cerebro y la médula espinal, causando daño a la vaina de mielina de las neuronas, lo que interrumpe la comunicación entre el cerebro y el cuerpo, provocando diferentes síntomas que varían en severidad y duración. A modo de ejemplo, en la Provincia de Santa Fe (Argentina) se estima una prevalencia de 30,3 casos por cada 100 000 habitantes [43]. Los tratamientos utilizados para esta enfermedad incluyen anticuerpos monoclonales, biofármacos inmunomodulares como el rhIFN- β y corticoides junto con antioxidantes que permiten disminuir el daño por estrés oxidativo debido a la respuesta inmunológica, pero que no tienen un efecto curativo de la patología, sino paliativo [42].

1.2.3. Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas constituyen un amplio grupo de patologías en las que se produce la pérdida progresiva de las neuronas y la función nerviosa en distintas regiones del cerebro, lo que ocasiona los síntomas característicos de cada enfermedad. En muchas de ellas, la enfermedad se desencadena por la desregulación de una determinada proteína que comienza a formar agregados intra o extracelulares. En la actualidad, aún no se conocen detalladamente las causas o los mecanismos por los cuales se produce el cambio del rol fisiológico de estas proteínas a un estado patológico [44,45].

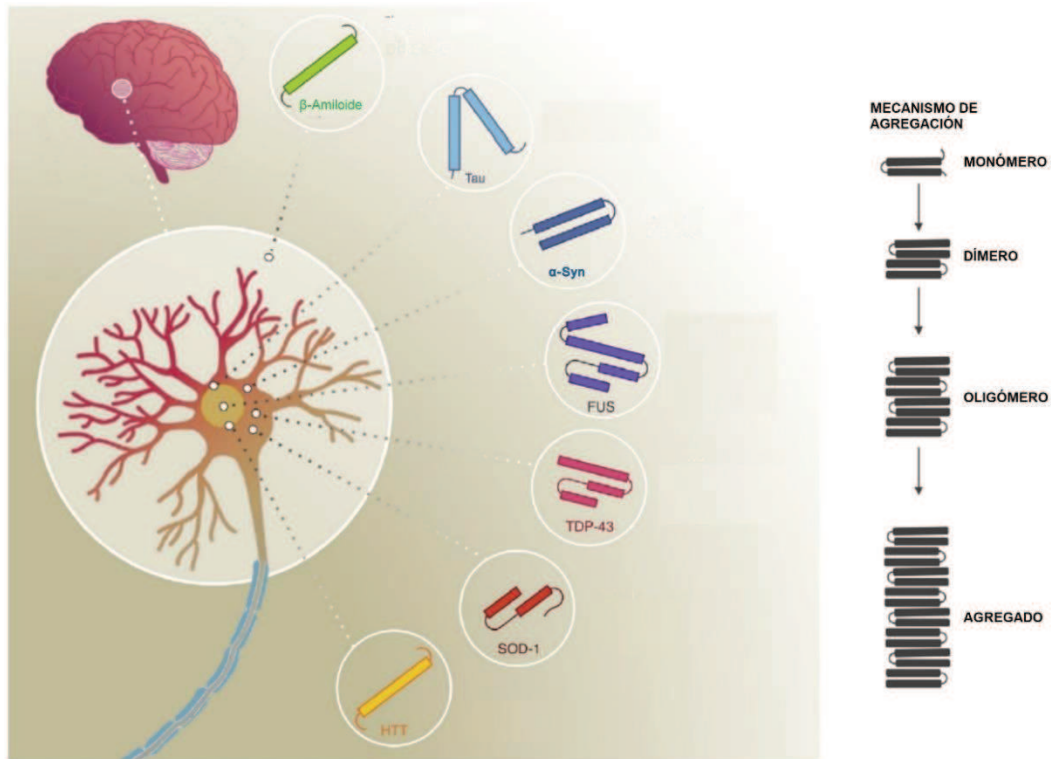


Figura 1. Proteínas involucradas en enfermedades neurodegenerativas. Figura modificada de Eftekharzadeh y col. (2016) [45].

Dentro de este conjunto de trastornos, las 2 enfermedades con más prevalencia a nivel global son la enfermedad de Alzheimer con una prevalencia estimada de 682,48 casos por 100000 habitantes a nivel mundial, seguida por la enfermedad de Parkinson que posee una prevalencia global de 138,63 casos por 100000 habitantes. Estas cifras reflejan una creciente carga global de ambas enfermedades, y las proyecciones indican un aumento significativo en las próximas décadas debido al envejecimiento de la población mundial [46,47].

A pesar del esfuerzo de numerosos centros de investigación, actualmente no existen tratamientos que permitan curar la enfermedad o, al menos, detener su progresión. Los fármacos disponibles en el mercado están dirigidos al control de su sintomatología. Sin embargo, la cronicidad de estas patologías provoca que la administración de los fármacos sea cada vez más frecuente y en dosis superiores, lo que por un lado encarece significativamente los tratamientos y, por el otro, conduce a la aparición de numerosos efectos adversos en los pacientes, sin beneficios perceptibles en relación con la progresión y/o cura de las mencionadas patologías. Por este motivo, hoy el desafío radica en el desarrollo de nuevos tratamientos capaces de atacar puntos clave en estas enfermedades,

tales como la apoptosis, el estrés oxidativo, la inflamación o que estimulan la neuroplasticidad. En estos aspectos, distintos estudios han propuesto a la eritropoyetina humana (hEPO) como candidato terapéutico para el tratamiento de enfermedades asociadas al SNC.

1.3. Eritropoyetina

La eritropoyetina es una glicoproteína que pertenece al grupo de citoquinas de tipo I, caracterizada como uno de los principales responsables de la generación de precursores eritroides en la médula ósea [48].

1.3.1. Estructura de la EPO humana

La secuencia aminoacídica que codifica para la hEPO está compuesta por 193 aminoácidos en su secuencia inmadura que incluye la secuencia de una señal secretoria de 27 aminoácidos y un residuo Arg en posición 193, que durante las modificaciones postraduccionales son eliminados, resultando en una proteína madura de 165 aminoácidos. La hEPO presenta 3 sitios de N-glicosilación ubicados en las Asn24, Asn38 y Asn83, junto con un sitio de O-glicosilación ubicado en la Ser126. La MM teórica del polipéptido es de aproximadamente 18,5 kDa, mientras que el de la glicoproteína oscila entre 30-39 kDa, por lo que los glicanos tienen un gran aporte en su MM. Es decir que entre un 40% y 50% de la masa total de la glicoproteína está representada por glicanos [49].

Las estructuras de glicanos presentes en esta proteína son de tipo complejo y pueden presentar variabilidad tanto en el número de antenas como en el contenido de ácido siálico. De forma teórica, la hEPO puede tener hasta 12 antenas (considerando estructuras tetraantenarias en los 3 sitios de N-glicosilación) y un máximo de 14 unidades de ácido siálico (considerando estructuras tetrasialiladas para los N-glicanos junto con el O-glicano bisialilado).

La rhEPO producida en células CHO.K1 como fármaco para el tratamiento de la anemia consiste en las glicoformas con mayor grado de ramificación y sialidación (Figura 2). Se ha reportado que la rhEPO producida en la línea celular CHO.K1 posee un contenido de 10,1 a 14,5 moles de ácido siálico por mol de proteína [50–53].

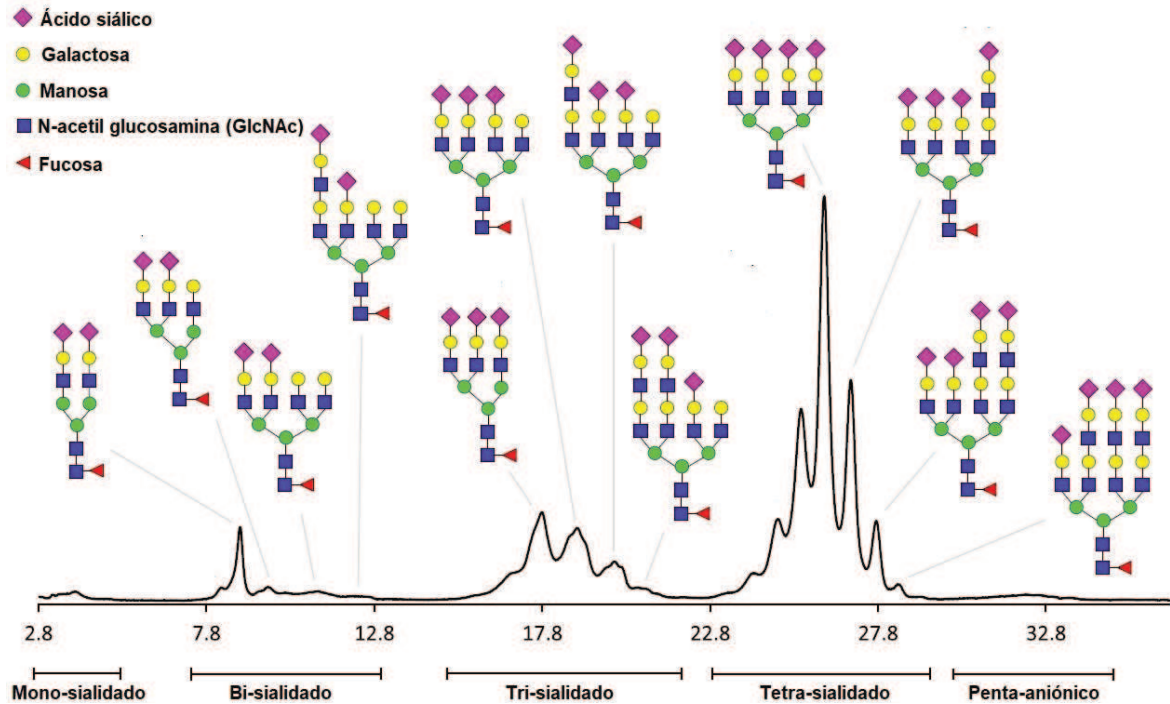


Figura 2. Estructuras de los N-glicanos presentes en la molécula de rhEPO. Se representan las diferentes estructuras agrupadas en función del número de residuos de ácido siálico presentes. La altura de cada pico en el cromatograma es directamente proporcional a la concentración relativa de cada estructura en función del total de isoformas presentes. Figura modificada de Cowper y col. (2018) [51].

Desde el punto de vista de su conformación tridimensional, la hEPO presenta una estructura altamente estable compuesta por 4 hélices alfa, denominadas A, B, C y D, conectadas entre ellas por *loops* largos sin estructura definida (Figura 3). Además, la hEPO presenta dos puentes disulfuro, el primero, entre los residuos Cys7 y Cys161 y, el segundo, entre los residuos Cys29 y Cys33, que juegan un rol muy importante en el correcto plegamiento de la molécula [54–56].

Si bien la hEPO es ampliamente conocida por su función eritropoyética, en los últimos años se ha demostrado que esta citoquina está presente también en tejidos no hematopoyéticos y cumple funciones protectoras y reparadora de tejidos. Estas actividades diferenciadas dependen de su interacción con dos tipos de receptores: un receptor homodimérico y otro heterodimérico, cuya descripción será abordada en la sección 1.3.3. Numerosos estudios estructurales y de mutagénesis sitio-dirigida han demostrado la presencia de tres dominios importantes e independientes relacionados con sus propiedades biológicas. Brines y col. [57] describieron dos sitios (1 y 2) involucrados en desencadenar la eritropoyesis mediante

su interacción con el receptor homodimérico (EPOR₂), junto con un sitio 3 asociado a funciones citoprotectoras a través de su unión al receptor heterodimérico (EPOR/βcR). El sitio 1, que incluye los residuos Asn147, Gly151 y Leu155 de la hélice D, junto con los residuos 24-51 del *loop* A-B, ha sido descrito como un sitio de alta afinidad para la unión al receptor homodimérico. Por su parte, el sitio 2, que comprende los residuos de las hélices A y C (Val11, Arg14, Tyr15, Ser100, Arg103, Ser104 y Leu108), representa un sitio de baja afinidad al receptor (EPOR₂). Finalmente, el sitio 3 está formado por los aminoácidos 58-82 de la hélice B, los cuales serían responsables de la actividad citoprotectora. Adicionalmente, los sitios de glicosilación de la hEPO se encuentran en una posición distante con respecto a los sitios de unión con ambos receptores [57,58].

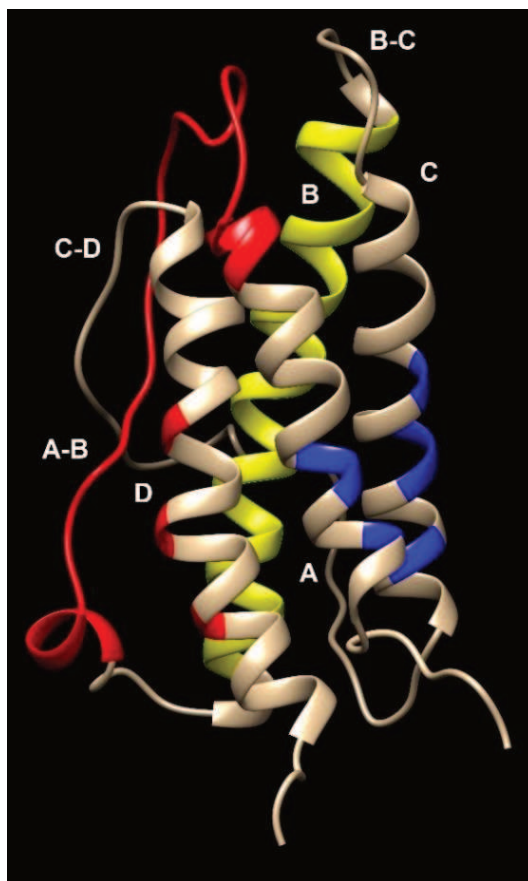


Figura 3. Modelo de la estructura tridimensional de la hEPO.

Las 4 hélices alfa se indican con las letras A, B, C y D mientras que las 3 asas de conexión o *loops* que las conectan se indican como A-B, B-C y C-D. Los residuos que forman los sitios descritos por Brines y col. se marcan con colores: sitio 1 de alta afinidad al receptor (EPOR₂) (rojo), sitio 2 de baja afinidad al receptor (EPOR₂) (azul) y sitio 3 asociado a la actividad citoprotectora (amarillo). Imagen adaptada del modelo de rhEPO generado por resonancia magnética nuclear (RMN) disponible en *Protein Data Bank* (PDB, código de modelo: 1BUY), descrito por Cheetham y col. (1998) [55].

1.3.2. Sitios de biosíntesis de hEPO

La biosíntesis de hEPO se encuentra regulada por la tensión del oxígeno tisular, y el sitio de producción de esta citoquina varía significativamente a lo largo del desarrollo. Durante el período fetal, el principal órgano productor es el hígado, en respuesta a la hipoxia fetal. Sin embargo, hacia el final del embarazo y, especialmente luego del nacimiento, los riñones asumen progresivamente la función principal de producción de hEPO, desplazando al hígado [59,60].

En la etapa adulta, los riñones producen del 80% al 90% de la hEPO en circulación, mientras que el porcentaje restante se produce en tejidos extrarrenales [69]. En los riñones, las células fibroblastoides peritubulares son las encargadas de su síntesis [61]. La expresión renal de hEPO es constitutiva en condiciones de normoxia, pero puede incrementarse mediante el reclutamiento de fibroblastos intersticiales adicionales cuando la tensión de oxígeno disminuye. En comparación, en el hígado, la hEPO es producida por hepatocitos y células no parenquimatosas, mostrando mayor expresión en zonas de baja tensión de oxígeno [48,62].

Además de estos dos órganos principales, la expresión de hEPO ha sido detectada en diversos tejidos, donde su producción puede ser inducida por hipoxia, estrés físico o bioquímico [63,64]. Particularmente en el cerebro, los astrocitos, las neuronas y las células de la microglía han demostrado ser capaces de sintetizarla y de expresar sus receptores. Un aspecto sumamente relevante que posee la hEPO producida en cultivos primarios de astrocitos provenientes del SNC es que exhibe una menor MM respecto de la hEPO que se encuentra en circulación sanguínea. Esta diferencia se debería a cambios en los patrones de glicosilación que determinarían estructuras más simples y que presenten mayor afinidad hacia el receptor (Figura 4) [65].

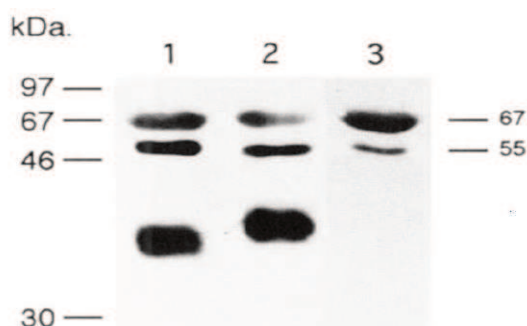


Figura 4. Western blot de variantes fisiológicas de hEPO. Calle 1, hEPO producida en cerebro conservada en solución salina de fosfatos (PBS, del inglés *phosphate-buffered saline*) con el agregado de albúmina sérica bovina (BSA, del inglés *Bovine Serum Albumin*) 0,1% (P/V); calle 2, hEPO sérica conservada en buffer PBS y BSA 0,1% (P/V); calle 3, buffer PBS y BSA 0,1% (P/V). Figura extraída de Masuda y col. (1994) [65].

1.3.3. Receptores de hEPO

El receptor de hEPO responsable de la eritropoyesis es un complejo compuesto por dos unidades del monómero EPOR. La MM teórica es de aproximadamente 56 kDa, sin embargo, se han registrado MM de hasta 78 kDa en la forma anclada a membrana debido a fosforilaciones y al sitio consenso de N-glicosilación presente en su secuencia. En ausencia del ligando, dos monómeros del receptor forman un dímero unido por enlaces disulfuro, que se integra en la membrana celular. El receptor homodimérico se compone de una región extracelular, un único dominio transmembrana y un dominio intracelular. La región extracelular contiene dos dominios que actúan como sitios de unión para hEPO: una molécula de esta proteína se une primero al sitio de alta afinidad y luego al sitio de menor afinidad (sección 1.3.1), lo que induce un cambio conformacional en el dímero [66].

La expresión de EPOR se ha demostrado también en tejidos no hematopoyéticos, tales como placenta, bazo, pulmones, retina, corazón y cerebro. Por este motivo, surgió la hipótesis de la existencia de un receptor alternativo ubicado sobre la superficie celular de estos tejidos que permita explicar sus funciones diferenciadas. Tiempo después, se identificó que en estos tejidos no hematopoyéticos la actividad de la hEPO es mediada por un heterodímero compuesto por un monómero de EPOR y una unidad del receptor β común (β cR, también conocido como CD131), que pertenece a la familia de receptores de citoquinas tipo I y es compartido con los receptores de GM-CSF y las interleuquinas 3 y 5 (IL-3 e IL-5). Hasta el momento, no se ha identificado un mecanismo que regule la formación preferencial del homodímero (EPOR₂) frente al complejo heterodimérico (EPOR/ β cR) a partir de la expresión de ambas subunidades [66–69].

La interacción de hEPO tanto con el receptor homodimérico como con el heterodimérico provoca un cambio conformacional que lleva a la transactivación de la proteína quinasa JAK2, que desencadena 3 vías principales de señalización intracelular: PI3K/Akt; Ras/MAPK y JAK/STAT5. Adicionalmente, la fosforilación de JAK2 provoca la disociación de NF- κ B de su complejo inactivo en el citoplasma. La activación de estas cascadas de señalización permite su traslocación al núcleo o conduce al reclutamiento de diversas proteínas que actúan como factores de transcripción, regulando genes relacionados no solo con la proliferación y diferenciación celular, sino con un efecto antiapoptótico, a través de la expresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl2 y Bcl-xL [66].

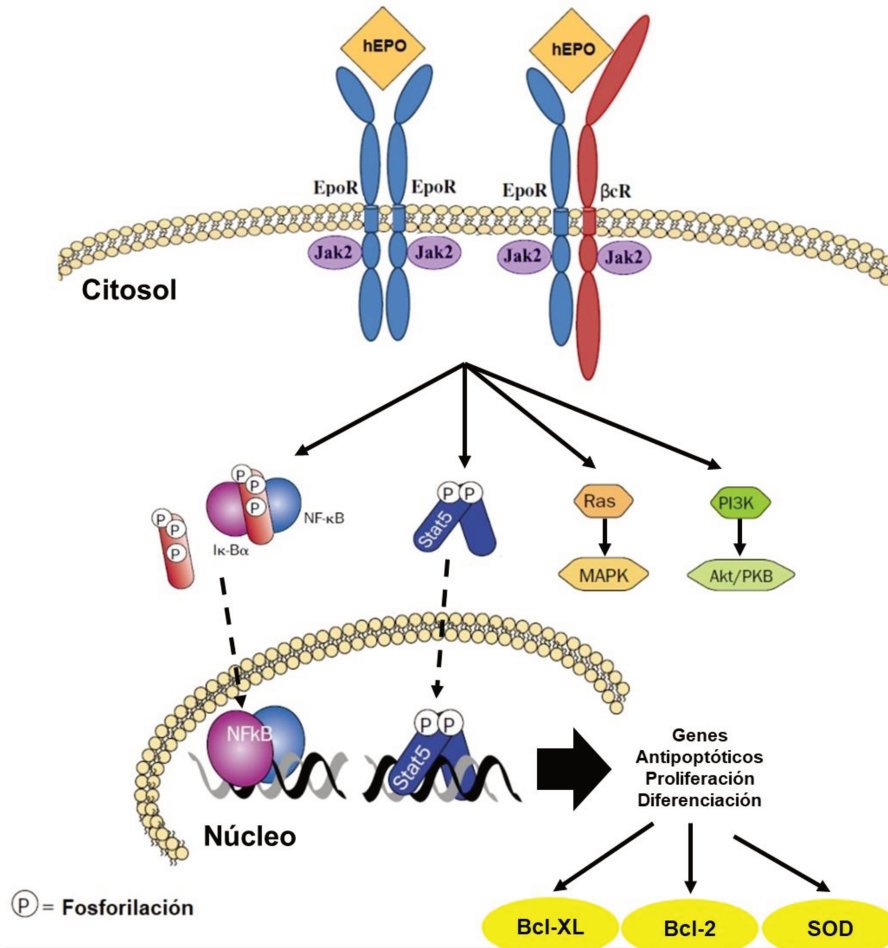


Figura 5. Vías de señalización activadas por hEPO. Las flechas continuas indican activación de cascadas de señalización, mientras que las flechas discontinuas representan la traslocación de factores de transcripción al núcleo. Figura modificada de Vittori y col. (2021) y Dawson y col. (2002) [66,70].

1.3.4. Actividad eritropoyética (AE)

La hEPO es uno de los principales reguladores de la masa de glóbulos rojos en sangre. Esta actúa de forma sinérgica con otros factores de crecimiento tales como interleuquinas, G-CSF y GM-CSF regulando la proliferación, diferenciación y supervivencia de progenitores de linaje eritroide en médula ósea, actuando de forma endócrina.

En circulación sanguínea, la hEPO interacciona con el receptor homodimérico de células precursoras eritroides tempranas BFU-E (*Burst Forming Unit-Erythroid*) estimulando la proliferación y diferenciación celular. En la siguiente etapa, las células más maduras denominadas CFU-E (*Colony Forming Unit-Erythroid*) tienen una alta dependencia de hEPO. En ellas, la hormona promueve fuertemente la proliferación celular, produce la

inhibición de la apoptosis y estimula la maduración de los eritrocitos, incluyendo la síntesis de hemoglobina y la transición hacia reticulocitos [71,72].

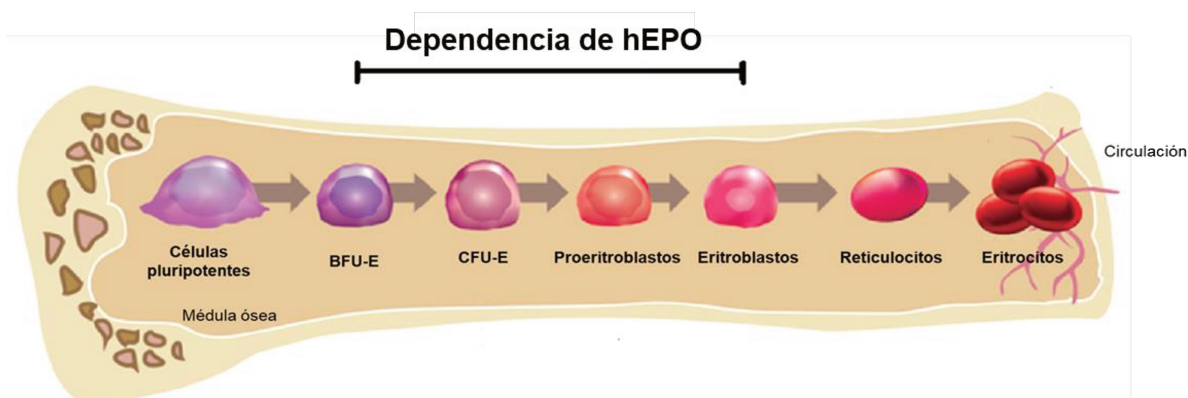


Figura 6. Rol de la hEPO en la eritropoyesis. Figura modificada de Elliot y Sinclair (2012) [72].

1.3.5. Actividad neurobiológica (AN)

De manera análoga a la eritropoyesis, la expresión de hEPO en el SNC se encuentra regulada por la tensión de oxígeno tisular y así es ampliamente estimulada en condiciones de hipoxia. Adicionalmente, otros factores que estimulan su expresión son estrés oxidativo, infección, inflamación, daño tisular e intensa actividad neuronal. La hEPO actúa de forma autócrina y parácrina, activando las cascadas de señalización PI3K/Akt, Ras/MAPK, JAK/STAT5 y NF- κ B, con la consecuente activación de la transcripción de numerosos genes asociados con efectos antiapoptótico, antioxidante, antiinflamatorio, neuroprotector y neuroplástico [68,69,73,74]. A continuación, se describen los efectos producidos por hEPO en el SNC con relación a su actividad neurobiológica.

1.3.5.1. Actividad neuroprotectora

La neuroprotección se basa en evitar, disminuir o inhibir la pérdida progresiva de las neuronas que forman parte del SNC, lo que permite proteger tanto a las células neuronales como a las diferentes interacciones y estructuras en las que participan. En este sentido, la apoptosis de las neuronas puede ser desencadenada por falta de oxígeno por isquemia, traumatismos, toxinas o condiciones inflamatorias.

La hEPO ha demostrado capacidad para proteger a las neuronas frente a un gran número de estímulos apoptóticos (hipoxia, estaurosporina, óxido nítrico, glutamato, 6-hidroxidopamina y la toxicidad inducida por la proteína β -amiloide) tanto en estudios *in vitro* utilizando líneas celulares establecidas (PC-12, SH-SY5Y, Neuro2A) o cultivos primarios de distintos tipos neuronales, así como en estudios *in vivo* utilizando modelos

animales de enfermedades neurodegenerativas y en diversos ensayos clínicos en humanos sobre patologías del SNC [73,75–77].

1.3.5.2. Actividad antioxidante

El estrés oxidativo es un desequilibrio entre la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*) y los mecanismos celulares para su neutralización. La falta de oxígeno provoca un aumento del estrés oxidativo debido a que las mitocondrias intentan mantener la producción de ATP, lo que conduce a un aumento en la generación de ROS. Esto se debe, por un lado, a la alteración de la cadena respiratoria mitocondrial, que favorece la fuga de electrones y la formación de radicales como el superóxido y, por otro lado, a la disminución de la eficiencia de los sistemas antioxidantes, muchos de los cuales dependen del oxígeno o del estado energético celular para su funcionamiento adecuado. La acumulación de niveles elevados de ROS produce daño celular y en una etapa posterior, la apoptosis.

La expresión de hEPO se ve incrementada en condiciones de hipoxia, aspecto que sugiere un posible efecto antioxidante. En este sentido, se ha demostrado que las cascadas de señalización activadas por esta proteína inducen la expresión de enzimas clave del sistema antioxidante, tales como hemo oxigenasa-1 (HO-1), peroxirredoxina, glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa (SOD, del inglés *Superoxide Dismutase*) [73,76].

1.3.5.3 Actividad antiinflamatoria

Los procesos inflamatorios en el SNC se encuentran mediados principalmente por células de la microglía y los astrocitos, junto con las quimiocinas y citoquinas liberadas por estas células, que aumentan la permeabilidad de la BHE y reclutan células del sistema inmune circulantes. El entorno proinflamatorio se encuentra particularmente aumentado en las enfermedades neurodegenerativas, como ocurre en la enfermedad de Alzheimer, debido a la acumulación de la proteína β -amiloide en forma de agregados extracelulares. Estos pueden ser captados por células de la microglía que actúan como presentadoras de antígenos, desencadenando el proceso inflamatorio, potencialmente peligroso para las neuronas.

Como mecanismo antiinflamatorio, la expresión de hEPO por parte de los astrocitos y las neuronas tiene la capacidad de disminuir la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF- α , principalmente a través de la vía de señalización de PI3K [78,79].

1.3.5.4. Actividad neuroplástica y neurogénica

El desarrollo de una neurona desde una célula precursora indiferenciada es un proceso altamente regulado. Este comienza a partir de células madre neurales, derivadas del ectodermo embrionario, que poseen la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse en los diversos tipos celulares del sistema nervioso. Estas células madre dan origen a células progenitoras neurales, que luego se diferenciarán en neuronas o células gliales.

Durante la neurogénesis, las progenitoras neuronales dejan de dividirse y activan programas específicos de expresión génica, mediados por factores como neurogenina, y reguladores de la vía Notch, que promueven la identidad neuronal. Estas neuronas inmaduras desarrollan múltiples prolongaciones morfológicamente similares denominadas neuritas. Posteriormente, migran hacia su destino final y allí inician un proceso llamado polarización, mediante el cual adquiere una morfología asimétrica: una de las neuritas se alarga progresivamente y se especializa como axón, encargada de transmitir señales, y las neuritas restantes se especializan en dendritas, que reciben estímulos. Esta polarización permite establecer conexiones sinápticas direccionales y funcionales, siendo esencial para la formación de circuitos neuronales precisos [80,81].

La maduración neuronal incluye la conexión entre neuronas denominada sinapsis y la integración funcional en redes neuronales, lo que está mediado por moléculas como los factores neurotróficos y por procesos de plasticidad sináptica. En relación con esto último, la neuroplasticidad es un proceso que permite a las neuronas modificar su anatomía y función, permitiendo la formación de nuevas conexiones sinápticas y la modificación de otras ya existentes, para favorecer la comunicación entre neuronas [82,83].

Numerosos estudios han permitido demostrar que la hEPO desempeña roles importantes en estos procesos. Teniendo en cuenta la actividad neurogénica, las vías de señalización activadas por hEPO en el SNC conducen al aumento de la expresión de moléculas neurogénicas como el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF, del inglés *Brain Derived Neurotrophic Factor*), una proteína que favorece el desarrollo de neuronas nuevas y la maduración de las existentes, incluyendo la formación de dendritas y axones [84,85].

Por otra parte, la hEPO es capaz de inducir la expresión de genes relacionados con la neuroplasticidad. Las vías de señalización mediadas por JAK2/STAT5 y PI3K/Akt pueden inducir la expresión de Egr1 (del inglés *Early Growth Response 1*), una proteína implicada en memoria y respuestas a estímulos neuronales. Además, produce un aumento en los niveles de Syn1 (sinapsina I) a través de la vía de Ras/MAPK, que regula la liberación de

neurotransmisores y la formación de sinapsis. Este aumento en la neuroplasticidad se correlaciona con una mayor actividad cognitiva [86–89].

1.3.6. hEPO como candidato neuroterapéutico

La evidencia obtenida con relación a la AN de hEPO ha permitido considerar a esta glicoproteína como un candidato para el tratamiento de enfermedades asociadas al SNC. Específicamente, la administración de rhEPO ha demostrado efectos beneficiosos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y Parkinson, la esclerosis múltiple y la recuperación de la función nerviosa luego de eventos de isquemia, entre otras patologías, tanto en modelos celulares *in vitro*, como en modelos animales y pruebas clínicas en humanos [90–96].

Si bien la rhEPO es una droga segura y bien tolerada en el organismo, cuando pretende ser utilizada para el tratamiento de estas enfermedades se debe tener en cuenta los efectos asociados a su función hematopoyética. En este sentido, su administración crónica en pacientes que no padecen anemia puede provocar la aparición de efectos secundarios tales como hipertensión, policitemia y fenómenos protrombóticos [97,98].

Teniendo en cuenta que se han descrito regiones moleculares independientes de la hEPO para ejercer el accionar eritropoyético y neurobiológico, distintos grupos de investigación han aplicado diferentes estrategias con el objetivo de desarrollar derivados de EPO que exhiban una disminución o bloqueo de la AE, pero que al mismo tiempo preserven la AN. A continuación, se describen algunas de las estrategias empleadas.

1.3.6.1. Modificación química

El ejemplo más representativo y estudiado de modificación química es el derivado carbamilado de rhEPO, denominado CEPO [67]. Este fue generado mediante carbamilación de los residuos de lisina presentes en la molécula original, transformándolos en residuos de homocitrulina. Esta transformación provoca un cambio conformacional en la molécula que determina la pérdida de la AE como consecuencia de la pérdida de interacción con el receptor homodimérico [67].

Ensayos clínicos en pacientes con eventos de isquemia y ataxia de Friedreich demostraron la seguridad de la aplicación de esta proteína para el tratamiento de dichas patologías [99,100]. Si bien la CEPO representa un candidato terapéutico interesante por su capacidad de preservar efectos citoprotectores sin inducir eritropoyesis, presenta desventajas inherentes a su obtención mediante carbamilación. Entre ellas se destacan el aumento en el costo y la complejidad del proceso de producción, debido a los pasos adicionales

requeridos para asegurar en forma controlada su modificación y la pureza del producto final. Asimismo, otros factores críticos a considerar lo representan la estabilidad y la antigenicidad que puede desencadenar la extensa modificación química realizada sobre la citoquina original ya sea por su modificación estructural o la generación de nuevos haptenos [78,101].

1.3.6.2. Péptidos derivados de hEPO

La existencia de regiones moleculares de hEPO independientes que se asocian con la AE o con la AN permitió el diseño de estrategias basadas en la expresión de péptidos derivados de la molécula original. Estos fueron diseñados a partir de las hélices internas de la hEPO (como la hélice B y la hélice C), con el objetivo de preservar sus propiedades citoprotectoras, sin desencadenar la eritropoyesis. En la Tabla 1, se describen algunos de los péptidos derivados de hEPO [102–107].

Tabla 1. Péptidos derivados de hEPO como candidatos neuroterapéuticos

Nombre	Longitud (aa)	Secuencia	Hélice- alfa de hEPO de donde derivan	Efecto
NL-100	11*	SGLRSLTLLRA	C	Neuritogenesis <i>in vitro</i> . Neuroprotección frente a A β 25-35 <i>in vitro</i> . Mejora en la memoria espacial en ratas. Modulación de la inflamación en ratas.
ARA 290	11	Pyr**-EQLERALNSS	B	Alivio del dolor neuropático en ratas.
CHBP	11	Tioéter-Pyr**-EQLERALNSS	B	Efecto antiapoptótico <i>in vivo</i>
Epotris	19	LQLHVDKAVSGLRSLTLLR	C	Neuritogénesis <i>in vitro</i> Neuroprotección <i>in vitro</i>
ML-1	23	LQLHVDKAVSGLRSLTLLRALG	C	Neuroprotección <i>in vitro</i> Efecto antiapoptótico <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>

* NL-100 se expresó como un dímero con un *linker* de lisina entre ambos péptidos.

** Pyr = ácido pirolutámico, forma cíclica del ácido glutámico o glutamina.

Además de los efectos neurobiológicos observados, el reducido radio hidrodinámico de estos péptidos en comparación con la rhEPO podría favorecer su pasaje a través de la BHE. No obstante, una desventaja común entre estos derivados peptídicos es su baja vida media plasmática como consecuencia de su reducido tamaño, aspecto que compromete su eficacia como candidato neuroterapéutico.

1.3.6.3. Modificación del contenido de ácido siálico

Esta estrategia se basa en la capacidad de los carbohidratos, y en particular del AS terminal, para modular la farmacocinética de las glicoproteínas. En el caso específico de la rhEPO, la presencia de residuos de AS es fundamental para generar una acción sostenida en términos de a eritropoyesis, mientras que la acción citoprotectora requiere una exposición breve [17].

En este sentido, se ha desarrollado una variante denominada asialoEPO, que consiste en rhEPO a la que se le realizó la remoción completa de los residuos de AS [108].

Esta modificación permitió anular la AE, determinada como la incapacidad para aumentar el hematocrito en ratas. Además, la asialoEPO demostró mayor afinidad por el receptor expresado en células P19 con respecto a rhEPO y la conservación de la actividad neuroprotectora tanto *in vitro* en células PC-12 como en modelos animales de isquemia [109]. Sin embargo, su vida media es de aproximadamente 4 min, lo que constituye una limitación clínica para el tratamiento de enfermedades crónicas [109,110].

1.4. Generación de muteínas hiperglicosiladas mediante glicoingeniería

Teniendo en cuenta la necesidad de desarrollar nuevos biofármacos para el tratamiento de enfermedades asociadas al SNC, los avances en los estudios estructurales y funcionales de la hEPO, así como el mejoramiento de las propiedades biológicas que aportan los glicanos, nuestro grupo de trabajo ha innovado en el desarrollo de variantes hiperglicosiladas de hEPO mediante glicoingeniería por hiperglicosilación [111].

Mediante mutagénesis sitio-dirigida se generaron muteínas de hEPO (Mut) en las que se reemplazó 1 o 2 aminoácidos de la secuencia de hEPO por los residuos Asn y/o Thr de manera de generar un sitio consenso de N-glicosilación adicional a los que la molécula ya dispone, en regiones importantes de la citoquina para desencadenar su función eritropoyética. Estas modificaciones fueron realizadas bajo la hipótesis de que la incorporación de un sitio adicional de N-glicosilación en regiones relevantes de la molécula para desencadenar su función eritropoyética permitirá disminuir o bloquear dicha actividad,

sin afectar su acción neuroprotectora y, simultáneamente, otorgar a las nuevas variantes propiedades farmacocinéticas mejoradas. En la Figura 7, se marcan las posiciones en las cuales se realizaron las mutaciones y se mencionan los aminoácidos reemplazados.

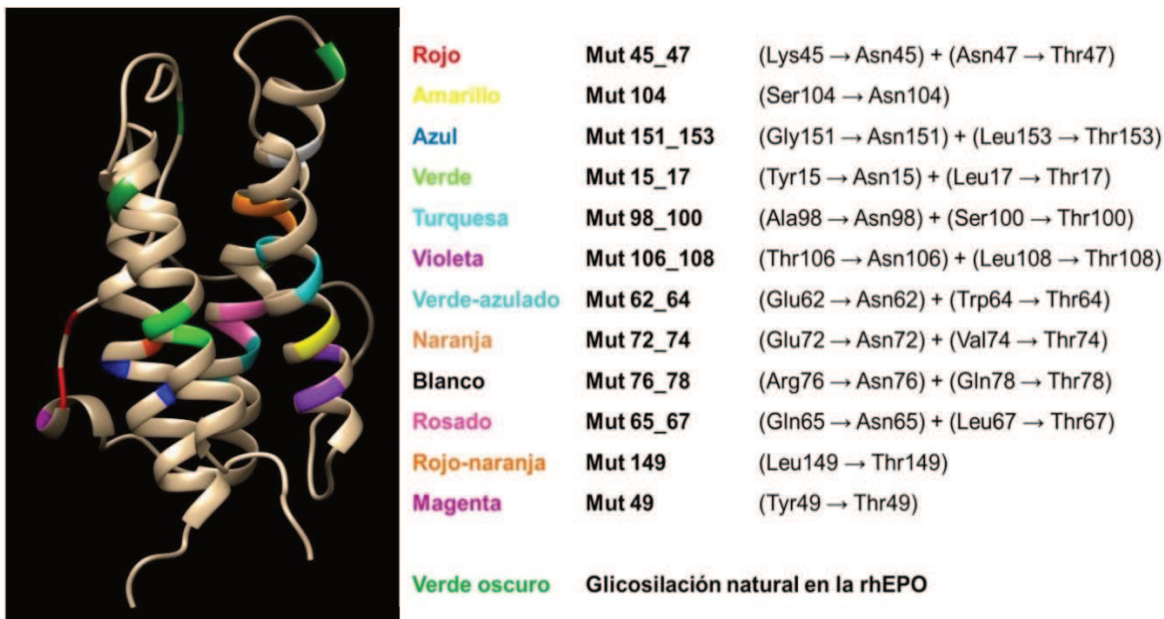


Figura 7. Muteínas hiperglicosiladas de hEPO. En la imagen de la izquierda se señala con diferentes colores la posición de los aminoácidos modificados. A la derecha se especifican los aminoácidos originales y sus correspondientes reemplazos. Imagen adaptada del modelo de rhEPO obtenido por resonancia magnética nuclear (RMN) disponible en *Protein Data Bank* (PDB, código de modelo: 1BUY).

Las nuevas muteínas de hEPO fueron diseñadas, considerando distintas regiones moleculares de la citoquina cuya función en la eritropoyesis y neuroactividad fue anteriormente mencionada. Así, se agruparon de la siguiente manera:

- **Grupo 1:** Muteínas con modificaciones en el sitio 1 de alta afinidad por el receptor homodimérico, que exhiban reducida o nula AE debido a la imposibilidad de interactuar con este, pero que preserven la AN. En este grupo se ubica la Mut 45_47, Mut 49, Mut 149 y Mut 151_153;
- **Grupo 2:** Muteínas con modificaciones en el sitio 2 de baja afinidad por el receptor homodimérico, que exhiban reducida o nula AE y que preserven la AN. Estas conservarían parcialmente la capacidad de unión al receptor homodimérico. En este grupo se ubican Mut 15_17, Mut 98_100, Mut 104 y Mut 106_108;
- **Grupo control:** Muteínas con modificaciones en la hélice B, que exhiban reducida o nula AN y que preserven la AE. Este grupo fue diseñado con el objetivo de constatar

que la disminución de la AE observada en los otros grupos está determinada por el bloqueo de la interacción hEPO-EPOR. En este se incluyen las variantes Mut 62_64; Mut 65_67; Mut 72_74 y Mut 76_78.

Las variantes de hEPO fueron generadas por mutagénesis sitio-dirigida mediante la técnica de *overlapping PCR* a partir del ADN_c del gen de la hEPO y luego clonadas en vectores plasmídicos. En una etapa posterior, se generaron líneas CHO.K1 recombinantes productoras de cada variante mediante transducción con partículas lentivirales de tercera generación.

Las variantes Mut 45_47, Mut 104 y Mut 151_153 fueron producidas, purificadas y ampliamente caracterizadas. Desde el punto de vista fisicoquímico, las muteínas exhibieron una mayor MM y la existencia de isoformas con pl más ácido respecto de rhEPO, como producto de la incorporación de la cadena adicional de N-glicano. En cuanto a la evaluación biológica, ensayos *in vitro* e *in vivo* demostraron el bloqueo de la AE, mientras que la AN fue preservada o incluso mejorada respecto de rhEPO, de acuerdo a ensayos de neuroprotección y neuroplasticidad *in vitro*, utilizando cultivos primarios de neuronas de hipocampo de ratas [111]. Estos resultados respaldan la hipótesis planteada para el diseño de estas variantes y destacan su potencial como candidatos neuroterapéuticos.

En base a estos resultados surge el interrogante de la posibilidad de generar una muteína de hEPO como las anteriores donde la incorporación de un sitio adicional de N-glicosilación bloquee la actividad hematopoyética y conserve la acción neurobiológica pero que al mismo tiempo exhiba similitud con la hEPO producida por el cerebro [65]. En este sentido, la línea celular HEK-293 resulta interesante debido a sus propiedades para generar glicoproteínas con estructuras glicosídicas más simples, menor contenido de AS y mayor capacidad de interacción con el receptor, aspectos que podrían asemejarse a lo previamente descrito para la hEPO producida en el cerebro [112–116].

Adicionalmente, los perfiles de glicosilación generados por células HEK-293 podrían favorecer el traspaso de la citoquina a través de la BHE, una estructura altamente selectiva y dinámica que controla el paso de sustancias entre la sangre y el parénquima cerebral, protegiendo al SNC de agentes patógenos, toxinas y fluctuaciones del entorno plasmático. La permeabilidad selectiva de la BHE constituye la principal barrera para el transporte de medicamentos hacia el cerebro, ya que depende de los mecanismos de transporte presentes en la misma [117]. Diferentes reportes han evidenciado que la rhEPO administrada de forma sistémica es capaz de atravesar la BHE y alcanzar el SNC, aunque se sabe que solo llega un 1-2 % [118–122]. En este sentido, la difusión a través de la BHE

INTRODUCCIÓN

se ve influenciada por las características fisicoquímicas y se encuentra favorecida para aquellas moléculas que exhiben menor tamaño y menor carga. De este modo, la expresión en células HEK-293 podría generar mutéínas que demuestren un aumento en la velocidad del transporte hacia el SNC, debido a las propiedades glicosídicas y fisicoquímicas que pueda aportar el hospedador celular [123].

2. OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo de tesis se desprende a un trabajo previo relacionado con la generación de nuevas moléculas análogas a hEPO con actividad neuroprotectora/neuroplástica y reducida actividad eritropoyética mediante glicoingeniería, adicionando un sitio potencial de N-glicosilación, en aquellas regiones identificadas como esenciales para ejercer su acción eritropoyética, sin modificar los residuos aminoacídicos necesarios para retener su actividad neurobiológica. La adición de glúcidos a la citoquina tuvo como propósito combinar un efecto dual: disminución de la eritropoyesis bloqueando sitios relevantes para desarrollar tal acción y prolongación de la vida media plasmática.

Dado que los antecedentes se han centrado en 3 variantes de las 12 inicialmente generadas, el presente trabajo se realizará a partir de las 9 variantes restantes, para las cuales se cuenta con las líneas de células CHO.K1 productoras. Con tal motivo, a continuación, se mencionan los objetivos del trabajo:

2.1. Objetivo general

Comparar la eficacia de células de hámster (CHO.K1) y de células humanas (HEK-293) para la producción de un candidato terapéutico basado en una variante de hEPO con actividad neuroprotectora/neuroplástica y reducida actividad eritropoyética.

2.2. Objetivos específicos

A- Expresión, purificación, caracterización fisicoquímica y biológica *in vitro* de nuevas variantes de hEPO que fueron modificadas para disminuir o bloquear su actividad eritropoyética y conservar su accionar neuroprotector y neuroplástico.

B- Selección de las muteínas que reúnan las mejores condiciones en cuanto a las actividades biológicas mencionadas con el fin de su producción mediante la generación de líneas celulares estables por transducción de células HEK-293. Este objetivo incluye la expresión, purificación, caracterización fisicoquímica y biológica de las muteínas producidas en las células humanas.

C- Comparación de las variantes producidas en células CHO y HEK con relación al contenido glicosídico, propiedades farmacocinéticas y actividad biológica *in vitro* e *in vivo*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos y soluciones

Todas las soluciones acuosas empleadas 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 utilizados fueron de grado de pureza analítica.

3.2. Líneas celulares de mamíferos y cepas bacterianas

A continuación, se detallan las líneas celulares utilizadas durante el presente trabajo de tesis, su origen y su utilidad:

- La línea **CHO.K1** fue obtenida de la Colección americana de cultivos (ATCC, del inglés *American Type Culture Collection, EEUU*) y corresponde a un clon de la línea celular CHO derivada de ovario de hámster chino adulto (ATCC CCL-61). Esta línea se empleó para la expresión de las variantes hiperglicosiladas de hEPO. En el resto del manuscrito se hará referencia a esta línea celular con la denominación **CHO**.
- La línea **HEK293 T/17** fue obtenida de ATCC (ATCC CRL-11268). Es un clon derivado de la línea celular HEK-293, establecida a partir de riñón de embrión humano. El clon 293T/17 fue modificado para generar la expresión del antígeno T del virus SV40. Esta línea se utilizó para el ensamblado de partículas lentivirales y también para la expresión de las variantes de hEPO como proteínas recombinantes. En el resto del manuscrito se hará referencia a esta línea celular con la denominación **HEK**.
- La línea **UT-7** fue obtenida de la colección alemana de microorganismos y cultivos celulares (DSMZ, del alemán *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*). Esta línea se estableció a partir de células de médula ósea de un paciente con leucemia mieloide. La misma fue utilizada para la evaluación de la actividad eritropoyética *in vitro* de rhEPO y de sus variantes.
- La línea **Neuro-2a** fue obtenida de ATCC (ATCC CCL-131). Esta línea se estableció a partir de un tumor neuroblástico inducido por administración de N-metilcolantreno como carcinógeno en ratones A/J. En el resto del manuscrito se hace referencia a esta línea celular con la denominación **N2a**. Fue utilizada para la evaluación de la neuritogénesis *in vitro*.
- El hibridoma (Hyb, del inglés *Hybridoma*) empleado en el presente trabajo de tesis es un clon celular productor del anticuerpo monoclonal (mAb, del inglés *monoclonal antibody*) murino de isotipo IgG1 anti-rhEPO, denominado mAb 2B2. Este clon fue desarrollado previamente en nuestro laboratorio mediante la fusión de células de

mieloma murino NS0 y esplenocitos de ratones de la cepa BALB/c inmunizados con rhEPO [124]. El mAb2B2 fue utilizado para la generación de matrices de IA y en ensayos de ELISA Sándwich (ES).

- La cepa bacteriana ***Escherichia coli (E. coli) TOP 10*** (Invitrogen) se empleó para el aislamiento y la amplificación de diferentes plásmidos.

3.3. Cultivos primarios de neuronas de hipocampo

Los cultivos primarios de neuronas de hipocampo utilizados para la evaluación de la formación de filopodios y sinaptogénesis fueron obtenidos a partir de embriones de ratas Sprague-Dawley de 19 días mantenidas en el bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (Universidad de Buenos Aires, Argentina). Las ratas preñadas fueron sacrificadas por dislocación cervical el día 19 de preñez y, a continuación, se procedió a la extracción de los embriones y decapitación de los mismos [125]. Las cabezas de los embriones fueron lavadas 2 veces con medio HBSGK (cuya composición se detalla en la sección 3.4). Posteriormente, los cerebros fueron extraídos de la cavidad craneal, se retiraron las meninges y los hipocampos fueron aislados y colocados en tubos de centrifuga de 15 mL en condiciones de esterilidad. A continuación, los tejidos fueron disociados enzimáticamente con una solución de tripsina 0,25% (V/V) en solución de Hank durante 15 min a 37 °C. Transcurrido el tiempo, se realizaron 3 lavados con el medio HBSGK de 5 min cada uno. Se procedió al descarte de los lavados, se agregaron 2 mL de medio Neurobasal (NB, Invitrogen) suplementado con suero y las células fueron resuspendidas hasta la obtención de una suspensión de células individuales.

Las neuronas fueron sembradas sobre cubreobjetos previamente tratados con bromuro de polilisina (Sigma) 0,1 mg.mL⁻¹ y laminina (Invitrogen) 20 mg.mL⁻¹, previamente colocados en placas estériles de 24 pozos en presencia de medio Neurobasal. Las neuronas se cultivaron durante 4 o 15 días *in vitro* (DIV), dependiendo del proceso de neuroplasticidad evaluado. El medio de cultivo fue renovado semanalmente, reemplazando la mitad del volumen en cada pocillo.

Las células fueron mantenidas a 37 °C y en atmósfera de 5% de CO₂.

3.4. Medios de cultivo

3.4.1. Medios de cultivo para células eucariotas

El suero fetal bovino (SFB) (PAA) empleado para la suplementación de los medios de cultivo basales fue previamente descomplementado por incubación en baño de agua termostatzado a 56 °C durante 30 min.

A continuación, se detallan los medios de cultivo empleados para cada línea celular:

- **CHO:** Se utilizó el medio de cultivo DMEM/Ham's F12, el cual consiste en una mezcla 1:1 (V/V) de los medios DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Gibco) y Ham's-F12 (Gibco), suplementados con NaHCO₃ (Gibco) 2,438 g.L⁻¹, glutamina (Sigma) 2 mM, sulfato de gentamicina (Gibco) 0,05 g.L⁻¹ y SFB en diferentes concentraciones según el ensayo. Se utilizó una concentración de 5% (V/V) para el crecimiento y mantenimiento del cultivo, y una concentración de 0,5% (V/V) para la producción en condiciones de adherencia.
- **HEK:** Se utilizó el medio DMEM, suplementado con NaHCO₃ 1 g.L⁻¹, piruvato de sodio (Sigma) 0,11 g.L⁻¹, glutamina (Sigma) 2 mM, sulfato de gentamicina (Gibco) 0,05 g.L⁻¹, y SFB en diferentes concentraciones según el experimento. Para el crecimiento y mantenimiento del cultivo se utilizó una concentración de 10% (V/V), mientras que para la producción en condiciones de adherencia una concentración de 0,5% (V/V).
- **UT-7:** Se utilizó el medio IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*, Gibco), suplementado con NaHCO₃ (Gibco) 3,024 g.L⁻¹, glutamina (Sigma) 2 mM, sulfato de gentamicina (Gibco) 0,05 g.L⁻¹, SFB 20% (V/V) y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos recombinante humano (rhGM-CSF, del inglés *recombinant human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*, Leucomax) a una concentración de 5 ng.mL⁻¹. Para los ensayos de proliferación se utilizó el mismo medio sin el agregado de rhGM-CSF.
- **N2a:** Se utilizó el medio DMEM suplementado con NaHCO₃ 3,7 g.L⁻¹, glutamina (Sigma) 2 mM, sulfato de gentamicina (Gibco) 0,05 g.L⁻¹ y SFB 20% (V/V).
- **Hyb 2B2:** Se utilizó la mezcla de medios DMEM/Ham's F12 (Gibco) y EXCELL-620 SFM (Sigma) en una proporción 2:1 (V/V). Ambos medios fueron preparados por separado y luego mezclados. El medio EXCELL-620 fue suplementado con NaHCO₃ (Gibco) 1,6 g.L⁻¹ y sulfato de gentamicina (Gibco) 0,05 g.L⁻¹.

- **Cultivos primarios de neuronas:** Como solución de lavado para las neuronas se utilizó el medio HBSGK, compuesto por 4,8 g.L⁻¹ de HEPES, 8,7 g.L⁻¹ de NaCl, 0,22 g.L⁻¹ de KCl y 0,2% (V/V) de glucosa. Para el mantenimiento de los cultivos se utilizó el medio Neurobasal suplementado con glutamina (Sigma) 2 mM, sulfato de gentamicina (Gibco) 15 µg.mL⁻¹ y suero de caballo (Gibco) 10% (V/V).

La esterilización de los medios de cultivo se realizó por filtración empleando filtros estériles con un tamaño de poro de 0,22 µm (Millipore). Previo a su uso, los medios fueron sometidos a controles de esterilidad durante 96 h a 37 °C y a temperatura ambiente (TA).

3.4.2. Medios de cultivo para células procariotas

Para el crecimiento bacteriano en medio líquido se utilizó el medio de cultivo Luria Bertani (LB), compuesto de triptona (Sigma) 10 g.L⁻¹, extracto de levadura (BD) 5 g.L⁻¹, NaCl (Sigma) 10 g.L⁻¹ y ampicilina (Bagó) 100 µg.mL⁻¹. La esterilización de los medios de cultivo se realizó en autoclave durante 15 min a una temperatura de 121 °C y 1 atm de presión.

3.5. Sistemas de cultivo de células eucariotas

Todas las líneas celulares eucariotas se cultivaron en estufa gaseada a 37 °C, en atmósfera de CO₂ al 5% saturada de humedad (Thermo).

Se emplearon los siguientes sistemas de cultivo:

- Placas multipozos de poliestireno (Greiner, NEST, JetBiofilm) de 96, 24, 12 y 6 pozos con una superficie de 0,4; 2,0; 5,0 y 9,6 cm² por pozo, respectivamente.
- Frascos T (Greiner, NEST) de 25, 75 y 175 cm² de superficie.
- Frascos Schott (Duran Schott) de 100, 250, 500 y 1000 mL.

Las células de las líneas CHO, HEK y N2a crecen adhiriéndose a una superficie sólida (sustrato), formando una monocapa. Para realizar subcultivos se las debe liberar de este sustrato por medios mecánicos o enzimáticos. De este modo, cuando los cultivos alcanzaron la confluencia, se procedió a retirar el sobrenadante y lavar la monocapa con una solución de tripsina-EDTA, compuesta por tripsina (Gibco) 0,05% (P/V) y Na₂EDTA (Gibco) 0,02% (P/V) en PBS [KH₂PO₄ (Sigma) 0,6 g.L⁻¹, Na₂HPO₄ (Sigma) 0,78 g.L⁻¹, NaCl 8,8 g.L⁻¹ (Sigma) pH 7,4] durante 15 s a TA, con el fin de neutralizar la acción de factores antitripsina presentes en el SFB. Se respetó una relación de 20 µL de solución de tripsina/EDTA por cada cm² de superficie.

Luego de eliminar la solución de lavado, se agregó nuevamente la misma proporción de la solución de tripsina/EDTA dejándola actuar el tiempo necesario hasta lograr el

desprendimiento completo de las células adheridas. Posteriormente, se adicionó el medio de cultivo suplementado con SFB para neutralizar la acción de la tripsina y se homogeneizó la suspensión celular.

Para la línea celular UT-7, que crece en suspensión, los subcultivos se efectuaron por simple dilución en el medio de cultivo fresco correspondiente.

El clon del Hyb 2B2 fue cultivado utilizando una incubadora orbital (Certomat CT plus, Sartorius) con control de humedad y atmósfera de CO₂ al 5%, temperatura de 37 °C y velocidad de agitación de 140 rpm. Para ello, se emplearon frascos tipo Schott con venteo, ocupados al 30% de su capacidad máxima. Los subcultivos se efectuaron por simple dilución en el medio de cultivo fresco correspondiente.

3.6. Determinación de la concentración de células viables, muertas y totales

El recuento celular se realizó en cámara de Neubauer, estimando la proporción de células muertas por el método de exclusión con el colorante de exclusión azul de tripán [126]. Esta técnica se basa en la permeabilidad de la membrana plasmática a ciertos colorantes. Las células no viables presentan una alteración de la permeabilidad en su membrana plasmática que permite el ingreso del colorante hacia su interior. Como resultado, se observan de color celeste o azul, mientras que las células viables mantienen intacta su membrana celular, impidiendo el ingreso de este colorante y se observan incoloras y refringentes al microscopio óptico.

Con este fin, la suspensión celular se incubó con una solución de azul de tripán 0,4% (V/V) en PBS y posteriormente se sembró en la cámara de recuento, empleando diluciones convenientes de acuerdo con la densidad celular de la muestra. Se contaron las células vivas (refringentes) y las muertas (azules), contenidas en cada uno de los cuadrantes de los extremos.

La concentración de células (X), ya sea vivas o muertas, se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación (Ec.):

$$X \text{ (cél. mL}^{-1}\text{)} = N^{\circ} \text{ de células contadas} \times 10^4 \times \frac{1}{4} \times \text{Dilución}^{-1} \quad \text{Ec. (1)}$$

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

$$Viabilidad (\%) = \frac{X_V}{X_T} \times 100 \quad \text{Ec. (2)}$$

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

3.7. Criopreservación de líneas celulares de mamífero

Una vez que se ha logrado la generación de una línea celular o bien de un clon celular con las características deseadas y libre de contaminación, es fundamental su conservación. La criopreservación constituye un método eficaz de conservación de células que garantiza el mantenimiento de sus propiedades metabólicas iniciales [127,128]. La conservación en nitrógeno líquido es uno de los métodos usualmente empleado para preservar líneas celulares [129], ya que genera mínimos deterioros celulares [130].

El daño celular inducido por el congelamiento y la descongelación es causado por la formación de cristales de hielo intracelulares y por efectos osmóticos [131]. La adición de un agente crioprotector, como el dimetilsulfóxido (DMSO) [132], y el empleo de una velocidad lenta de enfriamiento, aproximadamente 1 °C por min [133], minimizan estos efectos negativos.

Para la conservación en nitrógeno líquido, una vez realizado el recuento, las suspensiones celulares en fase de crecimiento exponencial se centrifugaron a 200 g durante 10 min a TA. Se descartó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en una solución de SFB y DMSO (Sigma) en una relación 90:10 (V/V), de manera de obtener una densidad celular de 2×10^6 cél.mL⁻¹. La suspensión celular se distribuyó a razón de 1 mL por criotubo (NEST, Tarson), los cuales luego fueron guardados en un dispositivo MrFrosty® (Nalgene), conteniendo isopropanol, y almacenados en un ultrafreezer de -70 °C por 24 h. Finalmente, los criotubos se almacenaron en termos de N₂ líquido a -196 °C.

3.8. Revitalización de líneas celulares de mamífero

El descongelamiento rápido de la suspensión celular es esencial para su óptima recuperación. Para la revitalización de las líneas celulares criopreservadas se retiró el criotubo del termo de N₂ líquido y se lo sumergió rápidamente en un baño de agua a 37 °C. La suspensión celular descongelada se transfirió a un tubo cónico que contenía 30 mL de medio de cultivo basal y se centrifugó a 200 g durante 10 min a TA. Esta etapa se realizó con el objetivo de eliminar el DMSO que es un reactivo tóxico para las células en cultivo. Se descartó el sobrenadante y el sedimento de células se resuspendió en un volumen de

medio de cultivo adecuado. Finalmente, se realizó el recuento celular con el objeto de evaluar la recuperación del cultivo y la viabilidad celular.

3.9. Técnicas de biología molecular

3.9.1. Maxipreparación de ADN plasmídico

Con la finalidad de obtener cantidades suficientes de los vectores que codifican para las variantes hiperglicosiladas de hEPO, se llevaron a cabo preparaciones de ADN plasmídico en gran escala (*maxiprep*) a partir de células procariotas transformadas previamente con los plásmidos de interés.

Para ello, 5 mL de medio de cultivo LB fueron inoculados con 200 μ L de células procariotas recombinantes los cuales fueron incubados a 37 °C, en agitación a 180 rpm durante 18 h. A continuación, se amplificó este cultivo a un volumen final de 50 mL, el cual se incubó durante 8 h para inducir su crecimiento. Seguidamente, los cultivos fueron centrifugados a 2500 g durante 10 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* celular fue resuspendido en 10 mL de glucosa 50 mM, EDTA 10 mM y Tris-HCl 25 mM pH 8 y se mantuvo en hielo durante 5 min. Posteriormente, se agregaron 20 mL de solución de NaOH 0,2 M y SDS 0,1% (P/V), se homogeneizó y se incubó en hielo durante 5 min. Luego, se agregaron 5 mL de CaCl₂ 6,6 M y 15 mL de acetato de potasio 5 M pH 5,2, se homogeneizó nuevamente y se incubó en hielo por 10 min. Luego se centrifugó a 2500 g por 30 min a 4 °C y el sobrenadante fue filtrado con papel de filtro en tubos cónicos de 50 mL. Se realizó una precipitación con 1 volumen de isopropanol a -70 °C durante 20 min y luego se centrifugó durante 20 min a 4 °C, a 2500 g. El *pellet* obtenido fue resuspendido en 1 mL de agua Milli Q estéril y dividido en dos tubos eppendorf, donde se realizaron extracciones con fenol saturado en Tris-HCl pH 8 y cloroformo en proporción volumétrica (1:1) con el objetivo de remover las proteínas de la muestra. Se centrifugó durante 5 min a 8000 g a TA y el ADN presente en la fase acuosa se precipitó durante 20 min a -70 °C con 0,6 vol. de isopropanol. Se centrifugó a 12000 g por 20 min a 4 °C y el *pellet* fue lavado con 300 μ L de etanol 70% (V/V). Luego se realizó otra centrifugación durante 5 min a 4 °C para lavar el *pellet*, se descartó el sobrenadante y se secó en un bloque seco termostatzado a 37 °C, hasta secar la muestra. El *pellet* obtenido fue resuspendido en 500 μ L de agua Milli Q estéril con 100 μ g.mL⁻¹ de RNasa A (Promega) y fue incubado por 1 h a 37 °C en bloque seco, para eliminar restos de ARN. A continuación, se realizó una nueva extracción con fenol saturado en Tris-HCl pH 8 y cloroformo (1:1), y la fase acuosa se precipitó durante 20 min a -70 °C con 0,6 vol. de isopropanol en medio acetato de sodio 0,3 M pH 5,2. Se centrifugó

a 12000 g por 20 min a 4 °C y el *pellet* fue lavado nuevamente con 300 µL de etanol 70% (V/V). Luego de la centrifugación, el *pellet* fue secado a 37 °C. Finalmente, el ADN fue resuspendido en 300 µL de agua Milli Q estéril y se determinó la concentración y pureza del ADN plasmídico obtenido a través de la medida de absorbancia a $\lambda=260$ y $\lambda=280$ nm.

3.9.2. Determinación de la concentración y pureza del ADN

Los ácidos nucleicos absorben luz ultravioleta debido a la presencia de bases aromáticas nitrogenadas a lo largo de sus cadenas, presentando un máximo de absorción a $\lambda=260$ nm; por lo tanto, a dicha λ la absorción es proporcional a la concentración de ADN. Una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a una concentración de 50 µg.mL⁻¹ de ADN doble cadena (ADN_{dc}). Se preparó una dilución 1:50 de las muestras de ADN a cuantificar y se determinó la absorbancia a $\lambda=260$ y $\lambda=280$ nm utilizando un espectrofotómetro UV-visible (NanoDrop Lite, Thermo Fisher Scientific) con el objetivo de determinar la concentración y pureza del ADN, según las siguientes ecuaciones:

$$\text{Concentración de ADN (}\mu\text{g. mL}^{-1}\text{)} = \text{DO}(260 \text{ nm}) \times 50 \frac{\mu\text{g. mL}^{-1}\text{ADN}}{\text{DO}} \times \text{Dilución}^{-1} \quad \text{Ec. (3)}$$

$$\text{Pureza de la muestra} = \frac{\text{DO}(260 \text{ nm})}{\text{DO}(280 \text{ nm})} \quad \text{Ec. (4)}$$

El valor de pureza debe estar comprendido en el rango entre 1,8 y 2. Fuera del mismo, la solución no es considerada apta para su uso en transfecciones de células eucariotas, ya que posee una cantidad considerable de contaminantes tales como proteínas o reactivos utilizados en la purificación del ADN, los que podrían afectar su eficiencia de transfección.

3.9.3. Electroforesis en geles de agarosa

Las separaciones de ADN en geles de agarosa se realizaron empleando el sistema submarino de Bio-Rad [134]. Para la preparación del gel se pesó 1 g de agarosa (Biodynamics SRL) y se disolvió en 100 mL de solución reguladora TAE (Tris-Acetato 40 mM pH 8, Na₂-EDTA 1 mM) en horno microondas hasta su completa disolución. La solución se enfrió a 60 °C y se adicionó el colorante SYBR® Safe DNA *gel stain* (Invitrogen) en una dilución 1:10000. 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 fue retirado luego de la solidificación de la preparación. El gel se colocó en una cuba electroforética y se cubrió completamente con solución TAE.

Las muestras de ADN se mezclaron con solución de siembra 10X [Ficoll 400 10% (P/V), azul de bromofenol 0,25% (P/V), Na₂-EDTA 50 mM, Tris 10 M pH 7,5] y se sembraron en las calles del gel. Se tapó la cuba y se aplicó un voltaje de 80 V hasta observar la migración de los colorantes de la solución de siembra a lo largo del gel.

Finalmente, el gel fue examinado utilizando un transiluminador Safe Imager™ (Invitrogen) y fotografiado. El fundamento de la detección de los fragmentos de ADN se basa en que el colorante SYBR® es un agente que se intercala con la doble hélice de ADN, incrementando notablemente su tasa de emisión fluorescente respecto del colorante libre.

3.9.4. Digestiones enzimáticas

Las digestiones con endonucleasas de restricción se realizaron respetando los medios y condiciones recomendados por el fabricante (Promega). En todos los casos, la reacción se llevó a cabo durante 2 h a 37 °C, empleándose 1 U de las enzimas XbaI y EcoRI por cada µg de ADN, en un volumen final de 20 µL. Luego de las digestiones enzimáticas, los fragmentos se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa para su posterior análisis.

3.10. Desarrollo de líneas celulares recombinantes

3.10.1. Vectores plasmídicos utilizados

En el presente trabajo se utilizaron vectores lentivirales de tercera generación [135]. Estos vectores se basan en el virus HIV-1 y han sido mejorados para optimizar su seguridad e infectividad. Estos poseen la capacidad de transferir elementos genéticos complejos, tales como secuencias policistrónicas o que contienen intrones, presentan un perfil de sitios de integración potencialmente seguro y un sistema relativamente sencillo para la manipulación y producción del vector. A continuación, se describen los vectores utilizados:

- **pRSV-REV**, induce la exportación nuclear del vector de transferencia y su empaquetamiento;
- **pMD2.G**, codifica la proteína G de envoltura del virus VSV, necesaria para el ingreso de la partícula viral en la célula, que provee estabilidad y un amplio tropismo a los vectores lentivirales;
- **pMDLS/pRRE**, codifica las proteínas de matriz y cápside, expresadas como poliproteína gag, capaz de empaquetar el vector de expresión, además de la poliproteína pol, que codifica la proteasa, la transcriptasa reversa y la integrasa, requeridas para el clivaje de los elementos estructurales y para el procesamiento del genoma del vector para su integración al genoma celular;

- **pLV-pLK Mut EPO**, también denominado vector de transferencia, que codifica para cada una de las variantes de hEPO (Mut 45_47 y Mut 104) y confiere a las células resistencia al antibiótico puromicina.

3.10.2. Generación de partículas lentivirales (PLV)

Con el objetivo de generar PLVs, se llevó a cabo una cotransfección transitoria de células HEK293 T/17, utilizadas como células empaquetadoras, respetando una relación de 1 μ L de lípidos por cada 1 μ g de ADN. Para ello, las células se sembraron a una densidad de 4×10^5 cél.mL⁻¹ en placas de 6 pozos y fueron incubadas toda la noche a 37 °C, 5% de CO₂. Al día siguiente, se preparó la mezcla de transfección. Para ello, se tomó un tubo de microcentrífuga con 0,25 mL de medio DMEM y se le adicionó 12 μ L de reactivo de transfección compuesto de lípidos catiónicos (FreeStyle™ MAX, Gibco), se agitó vigorosamente y se incubó a TA por 5 min.

En otro tubo de microcentrífuga con 0,25 mL de DMEM se agregaron 1,7 μ g del vector pRSV-REV; 4,3 μ g del vector pMDLS/pRRE; 2,4 μ g del vector pMD2.G y 3,3 μ g del vector de transferencia pLV-pLK-Mut EPO correspondiente. Posteriormente, se mezcló el contenido de ambos tubos e incubó durante 20 min a TA.

A continuación, se retiró el sobrenadante del cultivo de las células HEK y se agregaron los complejos lípidos/ADN gota a gota sobre la monocapa celular. Se incubó durante 4 h a 37 °C, 5% CO₂. Transcurrido el tiempo, se agregaron 2 mL de medio de cultivo DMEM con una concentración de SFB de 20% (V/V) y se incubó durante 48 h a 37 °C, 5% CO₂. Finalmente, el sobrenadante conteniendo las PLVs fue centrifugado a 200 g durante 10 min con el objetivo de eliminar células desprendidas de la monocapa o detritos celulares. Finalmente, el sobrenadante centrifugado fue fraccionado en alícuotas de 1 mL en tubos de microcentrífuga y conservado a -70 °C hasta su utilización.

3.10.3. Transducción con PLVs

Las líneas celulares HEK recombinantes fueron generadas por transducción con PLVs en condiciones de adherencia. Para ello, se cultivaron las células HEK a una densidad de 3×10^4 cél.mL⁻¹ en placas de 6 pozos toda la noche a 37 °C, 5% CO₂. Al día siguiente, se retiró el sobrenadante de cultivo, se agregó 1 mL de PLVs previamente obtenidas y se incubó toda la noche a 37 °C, 5% CO₂. Al día siguiente, se retiró el sobrenadante y se agregaron 3 mL de medio de cultivo fresco. Una vez que las células alcanzaron la

confluencia, se repitió el procedimiento de manera de realizar un total de tres transducciones para incrementar la expresión de cada proteína recombinante.

3.10.4. Selección de células recombinantes

Para seleccionar las células que incorporaron de forma estable el transgén, las mismas fueron presionadas con cantidades crecientes del antibiótico puromicina. Este proceso permitió la eliminación de las células no transducidas y al mismo tiempo el enriquecimiento de poblaciones celulares con mayores niveles de expresión de la proteína de interés.

Las células transducidas se cultivaron a razón de $1,5 \times 10^5$ cél.mL⁻¹ en placas de 6 pozos, toda la noche a 37 °C, 5% CO₂. Al día siguiente, se adicionó al cultivo puromicina en una concentración de 4 µg.mL⁻¹. Luego de 48 h, se eliminó el sobrenadante y se agregó medio de cultivo fresco. Una vez que se observó que el cultivo alcanzó la confluencia, se realizó un subcultivo aumentando la cantidad de antibiótico presente en el medio. Este paso se repitió las veces necesarias empleando concentraciones crecientes de puromicina (8, 20, 40, 80, 160 y 320 µg.mL⁻¹) hasta que el cultivo demostró un descenso en la viabilidad o en la productividad. Se seleccionó como condición final para la producción de las variantes de hEPO el estadio de mayor productividad.

3.10.5. Evaluación de la productividad celular

La productividad celular de las líneas recombinantes fue evaluada mediante ES indirecto (sección 3.12.1). Para ello, las líneas celulares fueron cultivadas en placas de 24 pozos a razón de 2×10^5 cél.mL⁻¹. Luego de 24 y 48 h, se tomaron los sobrenadantes de cultivo, se centrifugaron a 200 g por 10 min, se realizaron los recuentos celulares en cada uno de los pozos y se determinó la concentración de cada variante de hEPO mediante ES. El cálculo de la productividad celular fue realizado utilizando la siguiente ecuación:

$$Productividad\ celular\ (pg.\text{cél}^{-1}.\text{día}^{-1}) = \frac{Concentración_{48\ h}\left(\frac{pg}{ml}\right) - Concentración_{24\ h}\left(\frac{pg}{ml}\right)}{Células\ viables_{48\ h}\left(\frac{Cél}{ml}\right) - Células\ viables_{24\ h}\left(\frac{Cél}{ml}\right)} \quad \text{Ec. (5)}$$

La determinación de la productividad celular se realizó por duplicado.

La Figura 8 resume el proceso de generación de líneas celulares recombinantes productoras de las variantes de hEPO.

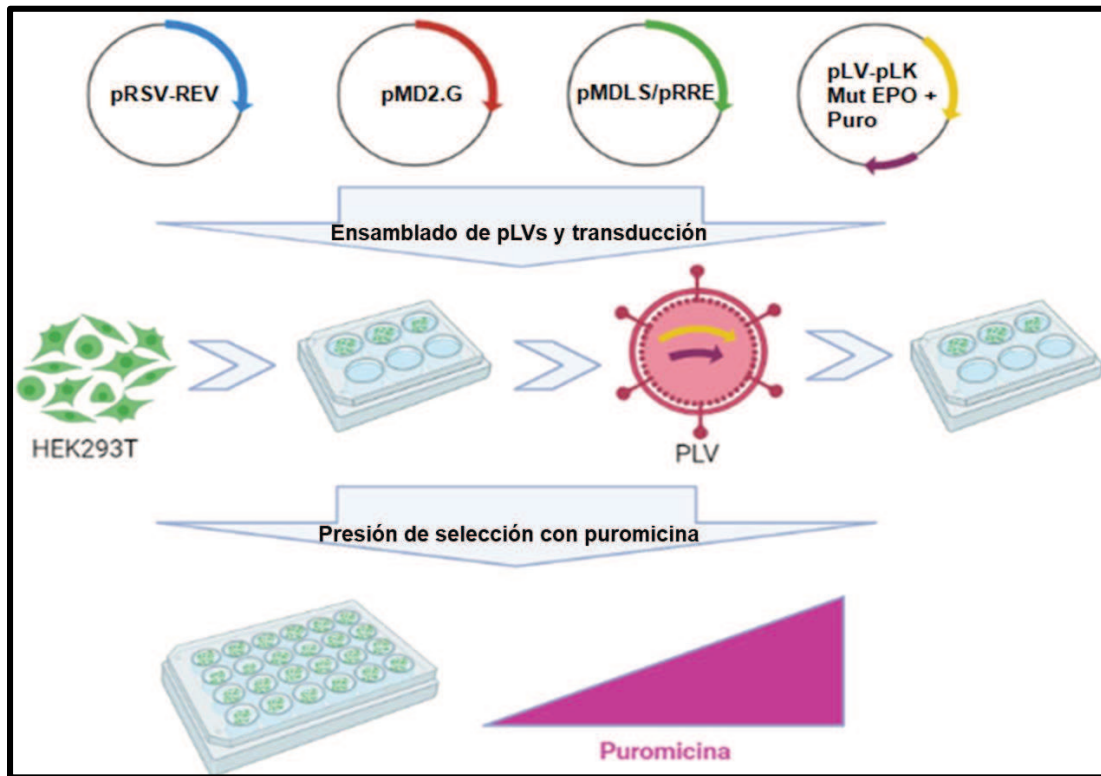


Figura 8. Representación gráfica del desarrollo de líneas celulares recombinantes.

3.11. Producción de proteínas recombinantes

3.11.1. Producción de las variantes hiperglicosiladas de hEPO

La producción de las muteínas se realizó en condiciones de adherencia, empleando frascos T de 175 cm² de superficie conteniendo un volumen máximo de 50 mL en cada frasco. Estos soportes fueron utilizados para la producción a partir de ambas líneas celulares recombinantes: CHO y HEK.

Las células se cultivaron a razón de 2×10^5 cél.mL⁻¹ en medio de cultivo de crecimiento correspondiente. Cuando las células alcanzaron la confluencia, dicho medio se reemplazó por el medio de cultivo de producción suplementado con SFB 0,5% (V/V). Se cosechó el sobrenadante de cultivo cada 48 o 72 h, reemplazándolo por medio fresco. Los sobrenadantes fueron centrifugados durante 10 min a 200 g y conservados a -20 °C para su posterior purificación. La concentración de cada cosecha para ser evaluada mediante ES.

3.11.2. Producción del mAb 2B2

La producción del mAb 2B2 se realizó mediante un cultivo en suspensión y en agitación, utilizando frascos tipo Schott de 1000 mL con un volumen de trabajo de 300 mL por frasco

respetando el 30% de su capacidad como máximo volumen de cultivo que permite alcanzar las mejores condiciones de producción. Estos fueron inoculados con una densidad celular de 4×10^5 cél.mL⁻¹. A las 96 h de cultivo, se realizó la cosecha de la mitad del cultivo, reemplazándolo por medio de cultivo fresco. El proceso se repitió hasta observar que la viabilidad celular cayó por debajo del 90%. Durante toda la producción se monitoreó el cultivo mediante recuento celular y determinación de la viabilidad celular. Con el propósito de remover agregados y detritos celulares, las cosechas fueron centrifugadas durante 10 min a 200 g y conservadas a -20 °C para su posterior purificación.

3.12. Cuantificación de las variantes hiperglicosiladas de hEPO mediante ES

3.12.1. ES indirecto

Este ensayo se basa en la captura de rhEPO por parte del mAb 2B2 inmovilizado sobre placas de poliestireno y su posterior reconocimiento por inmunoglobulinas (Igs) anti-rhEPO presentes en un suero hiperinmune obtenido en conejo. Estas, a su vez, reaccionan con un segundo anticuerpo generado en cabra (anti-Igs de conejo) conjugado a la enzima peroxidasa que catalizará la transformación de un sustrato incoloro en una sustancia coloreada. El protocolo se describe a continuación:

- A. Sensibilización:** se sensibilizaron placas de poliestireno de fondo plano de 96 pozos (Greiner, JETBiofilm) con 100 μ L del mAb 2B2 $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ diluido en solución de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 50 mM pH 9,6 (solución de sensibilización). Se incubó durante 1 h a 37 °C y toda la noche a 4 °C.
- B. Bloqueo:** el bloqueo de los sitios de interacción inespecífica se realizó con 200 μ L por pozo de una solución de leche descremada al 2% (P/V) preparada en PBS (solución de bloqueo). Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- C. Primera incubación:** se agregaron 100 μ L de diluciones sucesivas 1:2 del estándar para cuantificación de las muteínas (consistente en rhEPO diluida desde $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ hasta $0,0156 \text{ ng.mL}^{-1}$) y de las muestras a analizar en las diluciones convenientes. Para realizar las diluciones se empleó una solución de leche descremada 0,2% (P/V) en PBS con el agregado de Tween 20 0,05% (V/V) (solución diluyente). Se incubó durante 1 h a 37 °C. Se realizaron controles negativos (sin el agregado de rhEPO o muteínas) por triplicado.
- D. Segunda incubación:** se adicionaron 100 μ L de suero de conejo anti-rhEPO diluido 1:2000 en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37 °C.

- E. Tercera incubación:** se agregaron 100 μL de anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo conjugado con la enzima peroxidasa (Invitrogen) en una dilución 1:2000 en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- F. Reacción reveladora:** el revelado se realizó mediante reacción enzimática empleando como sustrato H_2O_2 0,015 volúmenes diluido en solución de citrato/fosfato de sodio 50 mM, pH 5,3 (solución de revelado) con el agregado del cromógeno *o*-fenilendiamina (OPD, Sigma) en una concentración de 0,5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Se colocaron 100 μL por pozo de dicha solución y, luego de 15 min de incubación en oscuridad a TA, se observó la aparición de color debido a que la enzima catalizó la reducción del sustrato con la simultánea oxidación del cromógeno. La reacción se detuvo mediante el agregado de 50 μL de H_2SO_4 2 N y la lectura del color se efectuó a una $\lambda=492$ nm en un lector de placas de microtitulación (Labsystems Multiskan MCC/340).
- G. Cuantificación:** se graficaron los valores de absorbancia en función de las correspondientes concentraciones del estándar de rhEPO y de las diluciones de las muestras en escala logarítmica. La concentración de las muestras se determinó utilizando el método de rectas paralelas.

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

3.12.2. ES indirecto amplificado

Las muestras correspondientes al análisis de las propiedades farmacocinéticas de las variantes de hEPO fueron evaluadas empleando el ensayo de ES indirecto amplificado.

Este procedimiento fue desarrollado y validado previamente en nuestro laboratorio [136] y consiste en el ES previamente descrito, con diferencias en las cantidades de los anticuerpos utilizados. Los cambios introducidos permitieron disminuir el límite de detección y cuantificación en 10 veces y aumentar la sensibilidad 1,6 veces comparado con la condición inicial; lo que resulta sumamente útil para la detección y cuantificación bajas concentraciones de proteína. A continuación, se describen las modificaciones al protocolo 3.12.1:

Sensibilización: se empleó 100 μL del mAb 2B2 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ diluido en solución de sensibilización.

Primera incubación: la curva del estándar de rhEPO se sembró desde 100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ hasta 0,039 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$

Segunda incubación: el suero de conejo anti-rhEPO se utilizó diluido 1:1000 en solución diluyente.

Tercera incubación: el conjugado se empleó en dilución 1:1000 en solución diluyente.

3.13. Purificación de las variantes hiperglicosiladas mediante cromatografía de inmunoafinidad (CIA)

3.13.1. Generación de las matrices de IA

Se emplearon matrices de IA mediante el acoplamiento del mAb 2B2 a Sepharose™ (GE Healthcare) activadas con CNBr siguiendo el protocolo del fabricante. Las mismas se empaquetaron en columnas XK 16/20 (GE Healthcare) de 16 mm de diámetro interno, conectadas a los cromatógrafos líquidos ÄKTA explorer™ 100 Air (GE Healthcare) o ÄKTA start™ (GE Healthcare).

Para generar las matrices de IA, el mAb 2B2 previamente purificado fue cuantificado mediante ES directo según el protocolo descrito a continuación:

- A. Sensibilización:** se sensibilizaron placas de poliestireno de fondo plano de 96 pozos (Greiner) con 100 μL de una solución de pAb anti-IgGs murinas (DAKO) 4 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ en solución de sensibilización. Se incubó durante 1 h a 37 °C y toda la noche a 4 °C.
- B. Bloqueo:** el bloqueo se realizó con 200 μL por pozo de solución de bloqueo y se incubó durante 1 h a 37 °C.
- C. Primera incubación:** se sembraron 100 μL por pozo de diluciones sucesivas al medio del estándar de mAb 2B2 desde una concentración de 500 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ hasta 3,9 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ y de las muestras a analizar en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37 °C. Se realizaron controles negativos por triplicado.
- D. Segunda incubación:** se adicionaron 100 μL por pozo de una solución de anticuerpos de conejo anti-IgG murinas conjugados con la enzima peroxidasa y diluidos 1:1000 en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- E. Revelado:** se colocaron 100 μL por pozo de solución de revelado y, luego de 15 min de incubación en oscuridad a TA, la reacción se detuvo mediante el agregado de 50 μL de H_2SO_4 2 N y se procedió a la lectura espectrofotométrica a $\lambda=492$ nm.
- F. Cuantificación:** se procedió de igual manera que para los ELISAS descritos en las secciones 3.12.1 y 3.12.2.

Todas las incubaciones se llevaron a cabo en cámara húmeda. Después de cada etapa se procedió a lavar 6 veces con solución de lavado.

3.13.1.1. Purificación del mAb 2B2

La purificación del mAb 2B2 a partir de las cosechas se realizó por cromatografía de afinidad a proteína A, utilizando 3 mL de resina MabSelect SuRe LX™ (GE Healthcare). Antes de comenzar el protocolo de purificación, se llevó a cabo el acondicionamiento de las muestras con el fin de lograr la interacción apropiada entre el mAb y la resina. El procedimiento consistió en el agregado de NaCl sólido hasta alcanzar una concentración de 3M y el posterior ajuste de pH a 9 mediante el agregado de una solución de Tris/HCl 1 M pH 10. Finalmente, la muestra se filtró mediante un sistema de filtración por vacío que emplea membranas de acetato de celulosa de 0,45 µm (Sartorius Stedim) y portafiltros de 500 mL de capacidad (Nalgene).

El protocolo de purificación se describe a continuación:

- A. Equilibrado:** la matriz se equilibró con 5 volúmenes de columna (VC) de solución NaCl 3M, Tris/HCl 50 Mm pH 9.
- B. Siembra:** la muestra acondicionada fue sembrada respetando la capacidad máxima indicada por el fabricante (60 mg de anticuerpo por mL de gel). El *flowthrough* (FT) se recolectó para su posterior análisis.
- C. Lavado 1:** la matriz se lavó con 5 VC de la solución de equilibrado.
- D. Elución:** las proteínas fueron eluidas mediante descenso de pH. Para tal fin, se emplearon 5 VC de una solución de ácido cítrico 0,1 M pH 3. Se recolectaron fracciones cada medio VC, las cuales fueron neutralizadas con solución de Tris/HCl 1 M pH 8. Todas las fracciones se conservaron a -20 °C para su posterior análisis.
- E. Lavado 2:** la matriz se lavó con 5 VC de una solución de fosfato de sodio 20 mM pH 7.
- F. Lavado 3 (CIP):** La sanitización de la resina se realizó con 2 VC de NaOH 0,1 M, NaCl 1 M.
- G. Lavado 4:** Se realizó un lavado de 5 VC con fosfato de sodio 20 mM pH 7 con el objetivo de neutralizar el pH de la resina cromatográfica y eliminar restos de la solución de sanitización.
- H. Conservación de la matriz:** la matriz se lavó con 2 VC de solución de conservación (etanol 20% (V/V) en solución de fosfato de sodio 20 mM pH 7) y se conservó a 4 °C hasta su reutilización.

Todas las etapas del proceso cromatográfico se realizaron a un flujo de 1 mL.min⁻¹. Cada lavado se recogió para su posterior análisis.

Finalizado el protocolo de purificación, se tomaron las fracciones correspondientes al pico de elución, y se determinó la concentración de anticuerpos mediante lectura espectrofotométrica a $\lambda=280$ nm, empleando como blanco de lectura la solución de elución neutralizada, y como coeficiente de extinción (ϵ) un valor de $1,2 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{mL} \cdot \text{cm}^{-1}$ y un paso óptico de la cubeta de 1 cm.

$$\text{Concentración Igs (mg. mL}^{-1}\text{)} = \frac{A_{\text{Muestra}} - A_{\text{blanco}}}{1,2 (\text{mg}^{-1} \cdot \text{mL} \cdot \text{cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm}} \quad \text{Ec. (6)}$$

La pureza de los anticuerpos se evaluó mediante SDS-PAGE seguido de tinción con colorante azul brillante de *Coomasie* (sección 3.14.1).

Finalmente, se tomaron las fracciones de los eluatos conteniendo la mayor masa de anticuerpos, y se dializaron en membranas de diálisis (Sigma) con un *cut-off* de 10 kDa y dializados contra solución de acoplamiento (NaCl 0,5 M, NaHCO₃ 0,1 M pH 8,3). La concentración del mAb 2B2 purificado y dializado se determinó mediante lectura espectrofotométrica a $\lambda=280$ nm, empleando como blanco de lectura la solución de diálisis. Seguidamente, el mAb 2B2 fue acoplado a la Sepharose activada con CNBr indicada respetando una relación de 5 mg de mAb purificado por cada mL de resina. El porcentaje de acoplamiento se calculó por medida de la concentración de Igs en la solución antes y después de la reacción de acoplamiento. Se consideró exitoso el acoplamiento si el mismo fue superior al 95 %.

3.13.2. Selección de la solución eluyente adecuada para su empleo durante el proceso de la CIA. Evaluación de su capacidad eluyente

Diversas soluciones preparadas a partir de diferentes especies químicas y con distintos pH fueron evaluadas con el objetivo de seleccionar aquellas que presenten la mayor capacidad para desorber las muteínas de hEPO retenidas por el mAb 2B2.

El ensayo se basó en un ES que simula la interacción entre la proteína y la matriz en la columna cromatográfica. Para tal fin, las variantes presentes en sobrenadantes de cultivo fueron capturadas mediante el mAb 2B2 inmovilizado en placas de poliestireno y se realizaron mediciones de la proteína retenida, luego del tratamiento con las diferentes soluciones candidatas a eluyentes del proceso cromatográfico. Las soluciones evaluadas fueron las siguientes:

- Glicina 0,15 M pH 2,5
- Glicina 0,15 M pH 3
- Glicina 0,15 M, NaCl 0,5 M pH 3

- Acetato de sodio 0,1 M pH 4
- PBS pH 7 (control)
- Glicina 0,1 M pH 10
- Glicina 0,1 M pH 11

El protocolo del ELISA se describe a continuación:

- A. Sensibilización:** se sensibilizaron placas de poliestireno de fondo plano de 96 pozos (Greiner) con 100 μL de una solución de mAb 2B2 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ diluida en solución de sensibilización. Se incubó durante 1 h a 37 °C y toda la noche a 4 °C.
- B. Bloqueo:** el bloqueo se realizó con 200 μL por pozo de una solución de leche descremada al 2% (P/V) en PBS. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- C. Primera incubación:** se sembraron 100 μL por pozo de los sobrenadantes de cultivo de las muteínas de hEPO en concentración de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ preparadas en solución diluyente. Se realizaron controles negativos incubando solo con solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- D. Segunda incubación:** se adicionaron 100 μL por pozo de cada solución eluyente durante 30 min a 4 °C.
- E. Tercera incubación:** se adicionaron 100 μL por pozo de una solución de suero de conejo anti-rhEPO diluido 1:2000 con solución diluyente durante 1 h a 37 °C.
- F. Revelado:** se realizó de acuerdo con el protocolo ya descrito para los incisos 3.12.1 y 3.12.2.
- G. Evaluación de la capacidad eluyente de cada solución:** se graficaron los porcentajes de proteínas retenidas obtenidos de la relación entre la absorbancia de las muestras tratadas con las distintas soluciones eluyentes y la absorbancia de la condición control (PBS), la cual fue considerada como el 100% de proteína retenida.

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

Asimismo, con el propósito de evaluar la integridad del mAb 2B2 luego de la acción de las soluciones utilizadas como posibles eluyentes, se realizó un ES como el mencionado previamente, en el cuál se invirtió el orden de siembra entre los sobrenadantes de cultivo conteniendo las proteínas de interés y las soluciones eluyentes. Luego se cuantificaron los porcentajes de proteína retenida con relación a la solución control de PBS. De esta manera,

el grado de afectación de la integridad del anticuerpo, se midió como la disminución del porcentaje de retención de la muteína luego de la etapa de preincubación con las soluciones candidatas a eluyentes de la CIA.

3.13.3. Protocolo de purificación de las muteínas derivadas de hEPO empleando la matriz de IA *Sepharose-mAb 2B2*

El proceso cromatográfico fue llevado a cabo empleando soportes XK16/20 (Merck) con adaptadores de flujo superior e inferior regulados para cargar la cantidad de matriz de IA deseada.

Como material de partida para el proceso de purificación se utilizaron las cosechas de sobrenadante de cultivo de cada una de las muteínas de hEPO cultivadas en condiciones de adherencia (sección 3.11.1). Luego de su descongelación, las muestras fueron acondicionadas con el agregado del detergente Tritón X-100 (Merck) hasta alcanzar una concentración de 0,3% (V/V) y filtrados mediante un sistema de filtración por vacío que emplea membranas de acetato de celulosa de 0,45 μm (Sartorius) y portafiltros de 500 mL de capacidad (Nalgene).

La purificación de las variantes hiperglicosiladas de hEPO a partir de los sobrenadantes de cultivo previamente acondicionados se efectuó de acuerdo con el siguiente protocolo:

- A. Equilibrado:** la matriz se equilibró con 5 VC de solución Tris/HCl 25 mM, Tritón X-100 0,3% (V/V) pH 7,5.
- B. Siembra:** la muestra acondicionada fue sembrada considerando la capacidad teórica de la columna (50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}$ resina⁻¹). El FT se recolectó para su posterior análisis.
- C. Lavado 1:** la matriz se lavó con 5 VC de solución Tris/HCl 25 mM; NaCl 0,5 M; Tritón X-100 0,2% (V/V) pH 7,5.
- D. Lavado 2:** la matriz se lavó con 5 VC de solución Tris 25 mM, NaSCN 1 M, Tritón X-100 0,1% (V/V) pH 7,5.
- E. Lavado 3:** la matriz fue lavada con 7 VC de solución de acetato de sodio 25 mM, NaCl 0,15 M pH 5 de manera de eliminar el remanente de Tritón X-100.
- F. Elución:** la elución fue realizada por cambio de pH. Para tal fin, se emplearon 5 VC de una solución de glicina 0,15 M pH 2,5 o pH 3, dependiendo de cada muteína. Se recolectaron fracciones de medio VC, las cuales fueron neutralizadas con solución de Tris/HCl 1 M, pH 8. Todas las fracciones se conservaron a -20 °C para su posterior análisis.

- G. Segunda elución:** la matriz se lavó con 5 VC de una solución de glicina 0,15 M pH 2,5 con el fin de desprender muteína aún retenida luego de la primera elución.
- H. Neutralización:** Se realizó un lavado de 5 VC con fosfato de sodio 20 mM pH 7 para neutralizar el pH del entorno de la resina cromatográfica.
- I. Conservación de la matriz:** la matriz se lavó con 3 VC de solución de conservación [fosfato de sodio 20 mM, etanol 20% (V/V) pH 7] y se guardó a 4 °C hasta su reutilización.

Todas las etapas del proceso cromatográfico se realizaron a un flujo que permita mantener un tiempo de residencia de 5 min. Las fracciones recolectadas durante el proceso de purificación (siembra, FT, lavados y elución) fueron analizadas mediante ES indirecto (sección 3.12.1).

Para determinar el éxito de la purificación se calculó la recuperación parcial de cada etapa (R), utilizando la Ec. 7, donde MR representa la masa de proteína de interés recuperada en cada etapa y MT, la masa total presente en la muestra de siembra. La recuperación total del proceso se calculó como la sumatoria de las recuperaciones parciales.

$$R(\%) = \frac{MR}{MT} \times 100\% \quad \text{Ec. (7)}$$

3.13.4. Concentración y diafiltración de las variantes hiperglicosiladas de hEPO

Las fracciones correspondientes al pico de elución de cada reiteración del proceso cromatográfico aplicado a una dada muteína se mezclaron, concentraron y diafiltraron empleando PBS. Para ello, se utilizaron dispositivos de ultrafiltración con una membrana de 10 kDa (Amicon™ Ultra-15 y Amicon™ Ultra-4, Millipore, dependiendo de los volúmenes a diafiltrar).

Una vez concentradas y diafiltradas, las muestras purificadas se analizaron mediante lectura espectrofotométrica a $\lambda=280$ nm y $\lambda=400$ nm. Para el cálculo de la concentración se consideró el coeficiente de absortividad para rhEPO de $0,743 \text{ mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (dado que no se realizó la modificación de residuos aromáticos en las muteínas generadas) y un paso óptico de 1 cm, de acuerdo con la Ec. 8. Como blanco de lectura se utilizó PBS.

$$\text{Concentración (mg. mL}^{-1}\text{)} = \frac{(A_{280 \text{ Muestra}} - A_{280 \text{ blanco}}) - (A_{400 \text{ Muestra}} - A_{400 \text{ blanco}})}{0,743 \text{ (mg. mL}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) \times 1 \text{ cm}} \quad \text{Ec. (8)}$$

La pureza de los eluatos diafiltrados se evaluó mediante SDS-PAGE con posterior coloración con azul brillante de *Coomasie* (sección 3.14.1).

3.14. Caracterización fisicoquímica

3.14.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida con el agregado de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)

La MM aparente y la pureza de las variantes de hEPO fueron analizadas mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras utilizando el sistema de electroforesis modular vertical Mini-Protean 3 (Bio-Rad). Los geles fueron preparados en condiciones desnaturizantes y reductoras, en presencia de SDS y un agente reductor de enlaces disulfuro (β -mercaptoetanol). Para ello, se utilizó un gel de apilamiento con una concentración de acrilamida/bisacrilamida de 5% (P/V) y un gel de separación con una concentración de acrilamida/bisacrilamida de 12% (P/V). Las muestras se prepararon con una solución de Tris/HCl 200 mM, SDS 8% (P/V), glicerol 40% (V/V), azul de bromofenol 0,2% (P/V), β -mercaptoetanol 10% (V/V), pH 6,8 (solución de siembra), utilizando una proporción muestra/solución de siembra de 3:1. Se sembraron 7,5 μ g de proteína por calle. Las muestras fueron incubadas a 100 °C durante 5 min para favorecer la desnaturalización de las moléculas, y sembradas directamente sobre el gel de apilamiento. La corrida electroforética se llevó a cabo empleando como solución de corrida: Tris 25 mM, glicina 0,2 M; SDS 0,1% (P/V), a un voltaje constante de 200 V, sumergiendo el módulo en baño de hielo. La corrida se detuvo una vez que el frente de corrida alcanzó 0,5 cm del borde inferior del gel de separación.

Luego de la electroforesis, cada gel se lavó con agua durante 5 min con el objetivo de eliminar el SDS remanente y, a continuación, el gel fue sumergido durante 10 min en solución azul brillante de *Coomasie* R-250 0,1% (P/V) en metanol 40% (V/V) y ácido acético 10% (V/V). Posteriormente, se decoloró con solución de metanol 7,5% (V/V) y ácido acético 5% (V/V) hasta aparición de bandas nítidas y disminución de la tinción de fondo. Como marcador de masa molecular (MMM) se utilizó la mezcla de estándares *Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards* (Bio-rad).

Cada gel fue digitalizado con un escáner (EPSON), procediéndose luego a la densitometría de las bandas empleando el *software* Gel Analyzer v2010a (Lazarsoftware).

Los rangos de MM aparentes de rhEPO y de sus variantes fueron calculados por interpolación a partir de la ecuación de la recta generada al graficar la distancia migrada de las proteínas en función del logaritmo de la MM de los estándares utilizados.

3.14.2. *Western blot*

Para evaluar la identidad de las proteínas producidas y purificadas, se realizó un *Western blot*. Luego de realizar el procedimiento de SDS-PAGE como se describió más arriba, pero en este caso sembrando 200 ng de proteína, se llevó a cabo la transferencia de las proteínas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Bio-Rad), utilizando un protocolo estándar de transferencia de proteínas. La transferencia se realizó en el sistema de electroforesis modular vertical Mini Protean 3 (transferencia sumergida), utilizando solución de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% (V/V)), a intensidad de corriente constante de 180 mA durante 1 h y refrigerando el dispositivo en todo momento. Posteriormente, se realizó la inmunodetección:

- A. Bloqueo:** los sitios libres de la membrana fueron bloqueados incubando con leche descremada 5% (P/V) en solución salina de Tris (TBS, del inglés, *Tris-buffered saline* y cuya composición y pH son los siguientes: Tris/HCl 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) durante 1 h a TA en agitación y toda la noche a 4 °C.
- B. Primera incubación:** La membrana fue incubada durante 1 h a TA en agitación con una solución de suero de conejo anti-rhEPO diluido 1:1000 con solución diluyente [TBS-Leche descremada 0,5% (P/V), Tween 20 0,05% (V/V)].
- C. Segunda incubación:** La membrana fue incubada durante 1 h a TA en agitación con una solución de anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo conjugados con la enzima peroxidasa (Invitrogen) y diluidos 1:2000 con solución diluyente.
- D. Revelado:** se empleó el *kit* de quimioluminiscencia Pierce™ *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. Posteriormente, se la escurrió y 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 min. El revelado de la película fotográfica se efectuó en forma manual empleando el método convencional de revelado y fijación (Reforzador y Fijador GBX, Kodak).

Luego de cada etapa, se realizaron tres lavados, sumergiendo la membrana de PVDF en solución de lavado (Tween-20 0,05% (V/V) en solución TBS) durante 5 min a TA y en agitación.

3.14.3. Isoelectroenfoque (IEF)

El análisis del perfil de glicoisofomas de las moléculas se realizó mediante focalización isoeléctrica, utilizando el sistema model 111 mini IEF cell (Bio-Rad) y una fuente de poder PowerPac 3000 (Bio-rad). La técnica de IEF se llevó a cabo en geles de 0,4 mm de espesor, con una concentración de acrilamida/bisacrilamida del 5% (P/V), urea 5 M, sacarosa 10% (P/V) y anfólitos 2% (P/V). Para obtener un gradiente de pH lineal y estable a lo largo del gel, con el pH más bajo cerca del ánodo y el más alto cerca del cátodo, se empleó una mezcla de anfólitos que cubren el rango de pI 3,5-5,5 (Bio-Lyte, Bio-rad). Una vez preparado el soporte electroforético, se sembraron 10 µg de proteína directamente sobre el mismo, a 1 cm del extremo superior, y se dejó reposar durante 10 min hasta que las muestras difundieron completamente en el gel. Posteriormente, se realizó el enfoque en condiciones de voltaje constante de forma escalonada, siguiendo las indicaciones del fabricante. Se comenzó con un voltaje de 100 V durante 15 min, luego, se continuó durante 15 min a 200 V y, finalmente, se prosiguió durante 90 min a 450 V. Finalizada la corrida, las bandas de proteína se revelaron mediante tinción con colorante azul brillante de *Coomassie* R-250 0,025% (P/V), metanol 20% (V/V), ácido acético 5% (V/V) toda la noche a 37 °C. Posteriormente, el gel se lavó repetidamente con agua para eliminar el exceso de colorante y se lo preservó en ácido acético 7% (V/V) hasta su completa decoloración antes de realizar su digitalización por escaneo.

3.14.4. Análisis de la estabilidad térmica

La estabilidad térmica de rhEPO y de sus variantes producidas por células CHO y HEK fue evaluada mediante la técnica de *Thermal Shift* como parte de un servicio brindado por PLABEM (Plataforma Argentina de Biología Estructural y Metabólica, Rosario, Argentina). Esta técnica se basa en la utilización de una sonda fluorescente que es capaz de unirse selectivamente a las regiones hidrofóbicas de las proteínas. Luego, mediante *real time* PCR, se registra la intensidad de fluorescencia emitida por el complejo sonda-proteína en un determinado rango de temperatura.

Para ello, las muestras purificadas y diafiltradas fueron diluidas en PBS estéril a una concentración de 0,3 mg.mL⁻¹. A continuación, se agregó la sonda fluorescente *SYPRO®* Orange (Merck) siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente, utilizando un termociclador, se procedió a registrar la intensidad de fluorescencia emitida por el complejo sonda-proteína en el rango de temperaturas comprendido entre 20 y 90 °C en incrementos regulares de 1 °C. Cada muestra fue evaluada por triplicado.

A partir de los datos de intensidad de fluorescencia obtenidos se realizó un ajuste no lineal que permitió determinar la temperatura de fusión (T_M , del inglés *melting temperature*), que corresponde a la temperatura a la cual se produce la transición del estado plegado al desplegado del 50% de la proteína.

3.15. Estudio de la glicosilación

3.15.1. Análisis de macroheterogeneidad

La macroheterogeneidad hace referencia a la heterogeneidad generada por la transferencia subestequiométrica de glicanos a una proteína. El grado de ocupación de sitios potenciales de N-glicosilación de las variantes de hEPO producidas en células HEK fue analizado siguiendo un protocolo de N-deglicosilación parcial en condiciones desnaturizantes. Para ello, en tubos de microcentrífuga se colocaron 13 μg de cada proteína junto con 2 μL de buffer desnaturizante 10X (New England Biolabs) y se llevó a volumen final de 20 μL con agua. A continuación, las muestras fueron desnaturizadas por calentamiento a 100 °C durante 10 min. Posteriormente, se prepararon tubos con 2 μL de *Glycobuffer 2* 10X (New England Biolabs), 2 μL de detergente NP-40 10% (V/V) (New England Biolabs), 15 U de PNGasa F (New England Biolabs) y 10 μg de las muestras previamente desnaturizadas en un volumen final de reacción de 20 μL .

Los tubos fueron incubados durante 1, 3, 30 min y toda la noche a 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, se les agregó 15 μL de solución de siembra para SDS-PAGE (sección 3.14.1), 24 μL de agua y se hirvieron durante 5 min. Las muestras fueron evaluadas por SDS-PAGE seguido de tinción con colorante azul brillante de *Coomassie*. Las variantes tratadas con PNGasa F fueron comparadas con cada una de aquellas sin deglicosilar.

3.15.2. Cuantificación de ácido siálico

La cuantificación de la variante de ácido siálico N-acetilneuramínico (Neu5Ac) de rhEPO y sus muteínas se realizó mediante cromatografía de intercambio aniónica a pH elevado con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD, del inglés *High-pH Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection*), empleando el sistema DIONEX ICS-5000 (Dionex, Thermo Fisher Scientific) equipado con una columna CarboPac™ PA20 (Dionex, Thermo Fisher Scientific) y una pre-columna AminoTrap™ (Dionex, Thermo Fisher Scientific). El ácido siálico fue escindido de las glicoproteínas mediante hidrólisis ácida con HCl 0,1 M a 80 °C durante 1 h. Luego, las muestras fueron llevadas a sequedad utilizando un concentrador de vacío (Savant SpeedVac, Thermo Fisher Scientific) y resuspendidas en

agua ultrapura. La cromatografía se realizó a 30 °C a un flujo de trabajo de 0,5 mL.min⁻¹. La elución se realizó utilizando un gradiente formado por fase A (NaOH 100 mM) y fase B (acetato de sodio 500 mM, NaOH 100 mM) descrito en la Tabla 2.

Tabla 2. Gradiente utilizado para análisis de Neu5Ac

Tiempo (min)	%Fase A	%Fase 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 derivados de las muestras se utilizó una curva de calibrado de estándar de Neu5Ac (Calbiochem) al cual se le realizó el mismo tratamiento que a las muestras. La curva de calibrado se construyó con la inyección de 5, 50, 100, 200, 300 y 500 pmoles de estándar.

La integración del área del pico correspondiente a cada muestra se realizó mediante el *software* Chromeleon v6.8 (Thermo Fisher Scientific). Los tiempos de retención descritos para el gradiente utilizado son de $5,3 \pm 0,1$ min para Neu5Ac y de $12,5 \pm 0,1$ min para Neu5Gc (no cuantificado en este trabajo de tesis). A partir de las áreas de la curva de calibrado se realizó una regresión lineal y la cuantificación de las muestras mediante interpolación con la ecuación de la recta. Cada muestra fue evaluada por triplicado en tres experimentos independientes.

3.16. Evaluación *in vitro* de actividad biológica

3.16.1. Evaluación de la actividad eritropoyética

El ensayo de valoración de la actividad biológica eritropoyética (AE) *in vitro* de la rhEPO se basa en el uso de la línea celular UT-7, que depende de la presencia de esta citoquina para proliferar. De esta manera, se evaluó la proliferación celular de estas líneas frente a rhEPO y de sus variantes hiperglicosiladas. La viabilidad celular se midió empleando el kit *Cell Titer 96TM AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (Promega), el cual se compone de dos reactivos: MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-

tetrazolium] en una concentración de $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y PMS (metasulfato de fenazina) en una concentración de $0,92 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. El protocolo empleado se describe a continuación:

1. Las células fueron cosechadas en fase de crecimiento exponencial y centrifugadas a 200 g durante 8 min . Luego de descartar el sobrenadante, las células fueron resuspendidas en 30 mL de medio de lavado y centrifugadas nuevamente. Se descartó el sobrenadante de lavado y el lavado se repitió 3 veces para eliminar el rhGM-CSF remanente del medio de crecimiento. Posteriormente, las células se resuspendieron en el volumen de medio de ensayo necesario para alcanzar una densidad de $2 \times 10^5 \text{ cél}\cdot\text{mL}^{-1}$ y se incubaron durante 3 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$.
2. En placas estériles de 96 pozos de fondo plano, se colocaron $50 \text{ }\mu\text{L}$ por pozo de diluciones sucesivas 1:2 de rhEPO o sus variantes preparadas en medio de ensayo (sección 3.4.1). El rango de concentraciones evaluadas fue de $8,4 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ a $66 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$.
3. Se adicionaron $50 \text{ }\mu\text{L}$ de suspensión celular en cada pozo (1×10^4 células por pozo) y las mismas se incubaron durante 72 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y 5% de CO_2 .
4. Se realizaron los siguientes controles:
 - Control positivo: para evaluar la máxima proliferación celular. Para ello, se colocaron $50 \text{ }\mu\text{L}$ de rhEPO $20 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$.
 - Control negativo: para evaluar la proliferación celular en ausencia de rhEPO. Para ello, se colocaron $50 \text{ }\mu\text{L}$ de medio de ensayo.
5. Transcurrido el tiempo de incubación, se agregaron $20 \text{ }\mu\text{L}$ por cavidad del reactivo de color (mezcla de MTS/PMS recientemente preparada). Se incubó durante 4 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y se realizó la lectura espectrofotométrica a una $\lambda=492 \text{ nm}$ contra lectura de fondo de placa a $\lambda=690 \text{ nm}$.
6. Se graficaron los valores de absorbancia del estándar o las muestras en función de las correspondientes concentraciones utilizadas, ambos en escala logarítmica.

Cada variante fue evaluada por triplicado en 3 ensayos independientes.

3.16.2. Evaluación de la actividad neurobiológica

La evaluación de la actividad neurobiológica (AN) de rhEPO y de sus variantes se basó en la medición del efecto neuroplástico que poseen estas moléculas sobre las neuronas. La plasticidad neuronal estructural engloba aquellos procesos por los cuales el desarrollo y/o diferenciación neuronal se encuentran estimulados o favorecidos. En este sentido, agentes o compuestos químicos que promuevan la formación de neuritas y/o el crecimiento axonal,

el desarrollo de filopodios/espinas dendríticas y/o incrementen el número de sinapsis serán considerados como compuestos neurotróficos. Los cultivos primarios de neuronas y las líneas de células neuronales han sido ampliamente utilizados para el estudio de dichos procesos *in vitro*. Estos estudios fueron realizados en colaboración con el Instituto de Investigaciones Biotecnológicas de la Universidad Nacional de San Martín (Buenos Aires, Argentina) a través del análisis del proceso de desarrollo neuronal dividido en 3 etapas: neuritogénesis, formación de filopodios y sinaptogénesis (Figura 9).

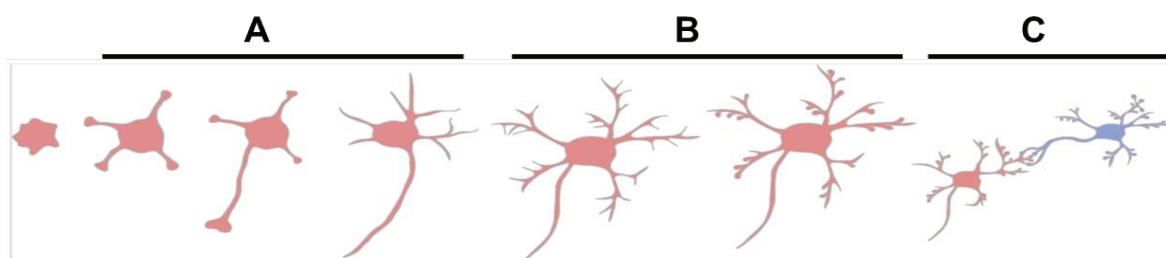


Figura 9. Representación esquemática del desarrollo de una neurona. (A) Neuritogénesis, (B) formación de filopodios y (C) sinaptogénesis.

3.16.2.1. Evaluación de la neuritogénesis

Para determinar si las muteínas derivadas de hEPO producían un efecto neuritogénico, es decir, el aumento del número y largo de neuritas por neurona, se utilizó la línea celular neuronal N2a. Estas células presentan la particularidad de crecer sin diferenciarse en presencia de SFB, pero al privarlas de éste, pueden adquirir un fenotipo neuronal a lo largo del tiempo. Para ello, se sembraron 3×10^4 células por pozo sobre cubreobjetos ubicados en placas de 24 cavidades de fondo plano, en un volumen final de 500 μL de medio de cultivo suplementado con SFB, e incubadas toda la noche a 37 °C y 5% CO_2 . Al día siguiente, se retiró el sobrenadante de cultivo y se agregó medio de cultivo DMEM sin SFB, suplementado con rhEPO o las muteínas en concentración de 50 y 300 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. Las células fueron incubadas durante 3 h a 37 °C y 5% CO_2 . Asimismo, se incluyeron controles de células tratadas con PBS o con SFB. El primero de ellos en medio sin SFB y en presencia de PBS para determinar la diferenciación basal en el período de incubación de las muestras, mientras que el segundo, consistió en células N2a incubadas con medio de crecimiento conteniendo SFB como control de no diferenciación a fenotipo neuronal. Luego del período de incubación, las células fueron sometidas a inmunocitoquímica (sección 3.16.2.4). Se realizaron 2 ensayos independientes.

3.16.2.2. Evaluación de la formación de filopodios

Los filopodios y las espinas dendríticas son protrusiones de membrana enriquecidas en filamentos de actina, las cuales emergen desde la neurita/dendrita y actúan como compartimentos postsinápticos que son muy abundantes en las sinapsis excitatorias del SNC. La morfología de las espinas es variable y se clasifica en base a su estructura diferencial. Se acepta que las espinas dendríticas pueden cambiar su forma/estructura durante el desarrollo neuronal favoreciendo la plasticidad neuronal [137]. Por ello se propuso determinar si las variantes hiperglicosiladas de hEPO eran capaces de inducir la plasticidad neuronal promoviendo la formación de filopodios. Para dicha evaluación se utilizaron cultivos primarios de neuronas de hipocampo de ratas (sección 3.3). Se cultivaron 3×10^4 neuronas por pozo en placas estériles de 24 pozos. Las células fueron sembradas sobre cubreobjetos previamente tratados con $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ de bromohidrato de poli-L-lisina (Sigma) y 20 mg.mL^{-1} de laminina (Invitrogen), lo que permitió su adherencia. Las células cultivadas fueron mantenidas durante 4 DIV a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y $5\% \text{ CO}_2$ en presencia de rhEPO o de las muteínas en concentración de 50 y 300 ng.mL^{-1} . Se incluyeron pozos con células tratadas con PBS como control negativo. Posteriormente, las células fueron sometidas a inmunocitoquímica (sección 3.16.2.4). Se llevaron a cabo dos ensayos independientes por condición.

3.16.2.3. Evaluación de la formación de sinapsis

Las sinapsis se definen como relaciones de contigüidad especializada (unión) de membranas entre dos neuronas. Esta unión, conocida como hendidura sináptica, facilita la conducción del impulso eléctrico y el pasaje de sustancias entre una (presináptica) y otra (postsináptica). Se han desarrollado distintas técnicas para cuantificar el número de sinapsis. De esta manera, se acepta que la colocalización de acúmulos de proteínas provenientes exclusivamente de un compartimento presináptico con acúmulos de proteínas provenientes exclusivamente de un compartimento postsináptico se define como sinapsis. Siguiendo con el estudio del efecto neurotrófico de las muteínas de hEPO, se propuso evaluar su capacidad para inducir sinapsis.

Para ello se utilizaron cultivos primarios de neuronas de hipocampo de ratas (sección 3.3) que fueron cultivados a razón de 3×10^4 neuronas por pozo en placas estériles de 24 pozos. Las células fueron sembradas sobre cubreobjetos previamente tratados de la misma manera que en el inciso anterior, y mantenidas durante 15 DIV a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y $5\% \text{ CO}_2$ en presencia de rhEPO o las muteínas en concentración de 50 y 300 ng.mL^{-1} . Se incluyeron

controles negativos mediante la incubación de las células con PBS. Posteriormente, las células fueron sometidas a inmunocitoquímica (sección 3.16.2.4). Se realizaron 2 ensayos independientes en los que la formación de sinapsis se midió como puntos de colocalización en 25 μm de dendrita entre el marcador presináptico y el marcador postsináptico en aproximadamente 10 a 20 neuronas por condición utilizándose 3 segmentos por neurona [138].

3.16.2.4. Inmunocitoquímica y análisis de la neuroplasticidad

La inmunocitoquímica se realizó siguiendo un protocolo similar al descrito por Formoso y col. [125]. Para la cuantificación de la extensión de las neuritas o la formación de filopodios, las células fueron fijadas durante 10 min a TA con paraformaldehído al 4% (P/V) y sacarosa al 4% (P/V) en PBS. Luego, se realizaron tres lavados con PBS y se procedió a la permeabilización celular con Tritón X-100 al 0,1% (V/V) en PBS durante 2 min. Las células permeabilizadas fueron bloqueadas con BSA al 3% (P/V) en PBS durante 1 h a TA, seguida de incubación con faloidina al 1% (P/V) en PBS conjugada con Alexa flúor 488, durante 1 h a 4 °C. Los cubreobjetos fueron montados con Mowiol (alcohol polivinílico, Sigma).

Las imágenes se adquirieron utilizando un objetivo de 60X en un microscopio confocal Olympus FV1000.

Para evaluar la neuritogénesis en células N2a, se cuantificó la longitud de las neuritas por célula y el promedio de la neurita más larga por célula, utilizando el complemento NeuroJ del *software* ImageJ (NIH).

Para determinar la densidad de filopodios se evaluó el número de protrusiones teñidas con faloidina por cada 20 μm de longitud de neurita medida hasta una distancia de 50 μm del soma de la neurona, en un mínimo de 10 a 15 dendritas por grupo.

Para la cuantificación de la sinaptogénesis, las neuronas fueron fijadas con una solución metanol/MES (90:10 v/v; buffer MES 100 mM pH 6,9; EDTA 1 mM y MgCl_2 1 mM) durante 5 min a 4 °C y, posteriormente, lavadas con PBS-Tween al 0,1% (V/V) durante 5 min. A continuación, se bloqueó con una solución SFB-Tritón X-100 [SFB al 10% (v/v) y PBS-BSA al 3% (P/V)] durante 30 min cada una a 25 °C. Los anticuerpos primarios (anti-NMDA-R1 y anti-sinaptofisina) se diluyeron en una solución de PBS-BSA al 1% (P/V) y se incubaron a 4 °C durante toda la noche.

Luego de 24 h, las células lavadas fueron nuevamente bloqueadas y, posteriormente, incubadas con anticuerpos de cabra anti-Igs. de ratón conjugados con Alexa flúor[®] 633 y con anticuerpos de cabra anti-Igs. de conejo conjugados con Alexa flúor[®] 568. Los

cubreobjetos fueron montados con Mowiol. Las imágenes de fluorescencia se adquirieron con un microscopio confocal Olympus FV1000.

Las imágenes fueron obtenidas con un tamaño de píxel de 1600 × 1600, en conformidad con el criterio de Nyquist. El número de sinapsis fue estimado mediante la cuantificación de los puntos de colocalización de los marcadores presináptico (syn) y postsináptico (NMDA-R1), determinados mediante la utilización del complemento *Puncta Analyzer* del software *ImageJ* (NIH) (Figura 10).

Para ello, se seleccionaron tres regiones de interés por neurona. Las neuronas seleccionadas se encontraban, como mínimo, a dos diámetros celulares de distancia de sus vecinas más cercanas. Posteriormente, se eliminó la señal correspondiente al fondo y los umbrales se ajustaron manualmente para cada canal de fluorescencia, estableciendo un tamaño mínimo de punto de 4 píxeles. Todos los experimentos fueron realizados en doble ciego, de modo de garantizar que el evaluador desconozca la identidad de los grupos experimentales para no sesgar los resultados durante el análisis de los datos.

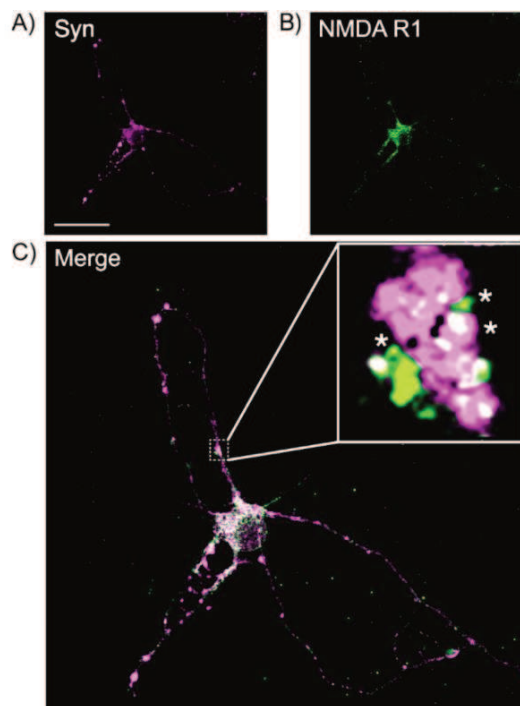


Figura 10. Representación gráfica de la cuantificación del número de sinapsis mediante el software *ImageJ* empleando el *plugging Puncta Analyzer*. A) y B) Imágenes representativas de neuronas de hipocampo de 15 DIV inmunomarcadas con el marcador presináptico sinaptofisina (Syn, magenta) y el marcador postsináptico NMDA-R1 (verde), respectivamente. C) Imagen combinada que muestra los sitios de colocalización (blanco) entre los marcadores pre- y postsináptico, destacados con asteriscos blancos y ampliados en el recuadro. Escala de la barra: 50 μm .

3.17. Evaluación *in vivo* de las propiedades biológicas de rhEPO y de sus variantes

3.17.1. Evaluación farmacocinética

Con el propósito de evaluar la influencia de la porción glicosídica sobre los parámetros farmacocinéticos (PK, del inglés *pharmacokinetics*) de rhEPO y de sus variantes, se realizaron experimentos *in vivo* utilizando ratas Wistar hembras de aproximadamente 200 g, procedentes del Centro de Medicina Comparada, ICIVET-CONICET-UNL. Las mismas fueron mantenidas en el bioterio del Centro Biotecnológico del Litoral a una temperatura controlada de 24 °C y un fotoperíodo luz/oscuridad de 12 h, proporcionándoles agua y comida *ad libitum*.

Los experimentos fueron iniciados una vez que los animales alcanzaron el peso esperado. Las ratas fueron separadas en lotes de ocho animales cada uno e inyectadas por vía intraperitoneal (ip) con solo una dosis de 100 µg de rhEPO o de cada una de sus variantes. 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. La toma de muestras de sangre se realizó con heparina a los tiempos postinyección: 30 min, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 24, 48, 72, 96 y 120 h. Las muestras fueron centrifugadas a 1000 g durante 5 min a TA, el plasma fue separado y conservado a -70 °C hasta su análisis. La cuantificación de cada proteína en el plasma se realizó mediante ES amplificado (sección 3.12.2). Los perfiles farmacocinéticos fueron obtenidos a partir de graficar las concentraciones plasmáticas de dichas proteínas en función del tiempo.

La curva obtenida se analizó aplicando un modelo de un compartimento, de inyección extravascular, con absorción lineal y eliminación de primer orden. Este modelo asume que, si la distribución de un fármaco es instantánea, tanto la velocidad global de absorción como la velocidad de eliminación, se pueden describir como procesos de primer orden. Además, el modelo describe la distribución de la droga en un único compartimento compuesto de tejidos corporales cinéticamente indistinguibles y su eliminación a partir del mismo. En el caso de una droga administrada de forma extravascular, el modelo puede ser descrito utilizando las mismas ecuaciones que una administrada en forma oral, donde la tasa de cambio de la cantidad de fármaco en el cuerpo en un momento dado depende de las velocidades relativas de absorción y eliminación del fármaco [139]. Esto se ilustra en la Figura 11, 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.

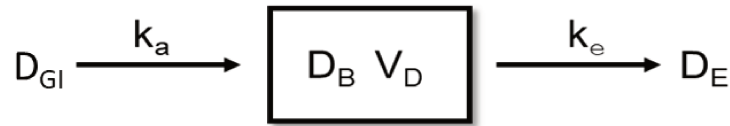


Figura 11. Modelo monocompartimental con absorción y eliminación de primer orden.

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

$$\frac{dD_{GI}}{dt} = -F \times D_{GI} \times k_a \quad \text{Ec. (9)}$$

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:

$$\frac{dD_B}{dt} = F \times D_{GI} \times k_a - k_e \times D_B \quad \text{Ec. (10)}$$

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:

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

En la Figura 12 se muestra un perfil típico de la concentración de una droga en el cuerpo luego de una única dosis extravascular. La máxima concentración plasmática luego de la administración se denomina $C_{m\acute{a}x}$ y el tiempo necesario para alcanzar dicha concentración $T_{m\acute{a}x}$, el cual es independiente de la dosis y depende de las constantes de absorción (k_a) y de eliminación (k_e).

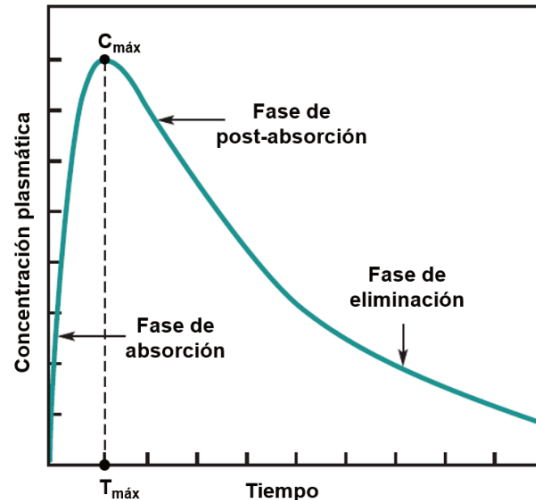


Figura 12. Perfil plasmático de una droga inyectada por vía extravascular.

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. Por lo tanto, al diferenciar la Ec. 11, simplificar y aplicar logaritmos, se obtiene una ecuación para la determinación de $T_{máx}$ (valor que luego se utiliza para el cálculo de $C_{máx}$):

$$T_{máx} = \frac{2.3 \times \log \times \left(\frac{k_a}{k_e}\right)}{k_a - k_e} \quad \text{Ec. (12)}$$

El tiempo de vida media de eliminación ($t_{1/2}$), es un parámetro que hace referencia al tiempo transcurrido hasta que la concentración plasmática de la droga se reduce a la mitad. se puede obtener a partir de la siguiente expresión:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k_e} \quad \text{Ec. (13)}$$

Otro parámetro importante que describe a una droga en un sistema dado es su velocidad de eliminación del organismo o *clearance*. Este es un término farmacocinético que describe la eliminación de fármacos del organismo sin identificar el mecanismo del proceso, considera a todo el organismo como un único sistema de eliminación de fármacos del que pueden producirse muchos procesos de eliminación no identificados. El *clearance* considera que la droga se encuentra uniformemente disuelta 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 dividido por su concentración en plasma. Para drogas que siguen una cinética de eliminación de primer orden, en donde la velocidad de eliminación de la droga depende de la cantidad de droga remanente en el cuerpo, la expresión matemática que permite determinar el *clearance* se expresa en la Ec. 14:

$$Cl = \frac{k_e \times C_p \times V_D}{C_p} = k_e \times V_D \quad \text{Ec. (14)}$$

La ecuación anterior muestra que el *clearance* es el producto entre dos constantes, V_D y k_e . El volumen aparente de distribución, V_D , no es un verdadero volumen fisiológico, sino que está relacionado con la salida de la droga del sistema circulatorio hacia tejidos periféricos. De este modo, las drogas con un V_D superior se encuentran concentradas predominantemente en tejidos extravasculares. En cambio, si la droga se encuentra fuertemente unida a proteínas plasmáticas o permanece en la región vascular, su concentración en plasma será mayor, resultando en un menor volumen aparente de distribución.

Los datos de concentración a distintos tiempos posinyección para cada variante fueron cargados en el *software* Monolix 2023R1 (Lixoft SAS, a Simulations Plus Company) y ajustados al modelo previamente descrito. Como resultado del ajuste, el *software* proporciona los valores de k_a , V_D y k_e .

Para el cálculo de los demás parámetros farmacocinéticos, se cargaron las ecuaciones correspondientes en el *software* Simulx 2023 R1 (Lixoft SAS, a Simulations Plus Company) junto con los valores de k_a , V_D y k_e previamente obtenidos y la dosis inyectada a cada rata (100 μg). De este modo, se obtuvieron los valores de parámetros farmacocinéticos de $T_{\text{máx}}$, $C_{\text{máx}}$, $t_{1/2}$, AUC y Cl.

3.17.2. Evaluación de la actividad neuroplástica *in vivo*

La actividad neuroplástica *in vivo* de rhEPO y de sus variantes fue evaluada a través del estudio del árbol dendrítico de neuronas piramidales presentes en la región CA1 del hipocampo de ratones (Figura 13). El árbol dendrítico hace referencia a la red de prolongaciones de una neurona y resulta fundamental en la comunicación interneuronal, ya que es capaz de recibir señales químicas y eléctricas de otras neuronas a través de las sinapsis y transmitir las hacia el soma para su integración.

Determinadas moléculas que poseen actividad neurogénica y neuroplástica provocan cambios morfológicos en el árbol dendrítico, caracterizados por un aumento en la cantidad y longitud de las dendritas, que *in vivo* influye directamente en el número y la calidad de las conexiones sinápticas, lo que se traduce en una plasticidad neuronal mejorada. Para evidenciar este efecto se utilizó la técnica histológica de tinción de Golgi-Cox.

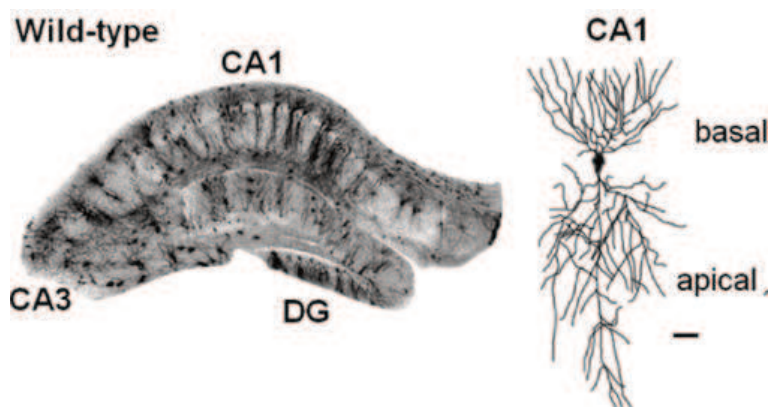


Figura 13. Fotografía de corte coronal de hipocampo de ratón y esquema de una neurona piramidal de la región CA1.

Ratones machos de la cepa CF1 de 8-12 semanas de vida, mantenidos en el Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIBio-UNSAM), fueron inyectados por vía ip con PBS, rhEPO o las muteínas expresadas por ambas líneas celulares durante 4 días consecutivos, utilizando dosis de $50 \mu\text{g}$ de proteína. kg^{-1} de peso corporal. Seguidamente, se sacrificaron los animales por dislocación cervical y se procedió a la extracción de los cerebros. Los mismos fueron sometidos a la tinción de Golgi-Cox, que es una técnica histológica utilizada para estudiar la morfología de las neuronas con un elevado nivel de detalle, permitiendo visualizar la estructura completa de las neuronas, incluyendo el soma, el axón y las dendritas. Para la realización de esta técnica se siguió el protocolo elaborado por Zaqout y Kaindi (2016) [140], descrito a continuación:

Los cerebros de los ratones fueron removidos de la cavidad craneal, lavados cuidadosamente con agua doblemente destilada y cortados por la mitad. A continuación, fueron sumergidos en recipientes con solución de tinción [$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 1% (P/V); HgCl_2 1% (P/V) y K_2CrO_4 0,8% (P/V)] durante 24 h a TA. Al día siguiente, los cerebros fueron transferidos a nuevos recipientes con solución de tinción y mantenidos durante 15 días a TA.

Transcurrido el tiempo, los cerebros fueron lavados con agua doblemente destilada y colocados en recipientes con solución de crioprotección CryoplastR (Biopack) durante 48 h a 4 °C en oscuridad. Posteriormente, los cerebros fueron colocados en un criostato Leica (Leica Microsystems) para realizar cortes coronales de 160 μm de espesor. Las secciones fueron montadas sobre portaobjetos con carga positiva, teñidas, deshidratadas y cubiertas con cubreobjetos utilizando Mowiol.

Se adquirieron imágenes de al menos cinco neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo por animal mediante un microscopio de campo amplio Zeiss equipado con una cámara Axiocam Mono 202 y el *software Zen Blue* (versión 3.0 de Zeiss). Las arborizaciones dendríticas fueron trazadas manualmente utilizando el complemento NeuroJ [141] dentro del entorno del *software* ImageJ (NIH). Posteriormente, las neuronas trazadas fueron analizadas mediante el complemento *Sholl Analysis* en ImageJ. Para medir la longitud dendrítica y el número de intersecciones, se colocaron círculos concéntricos a intervalos regulares de 10 μm desde el centroide del soma (Figura 14).

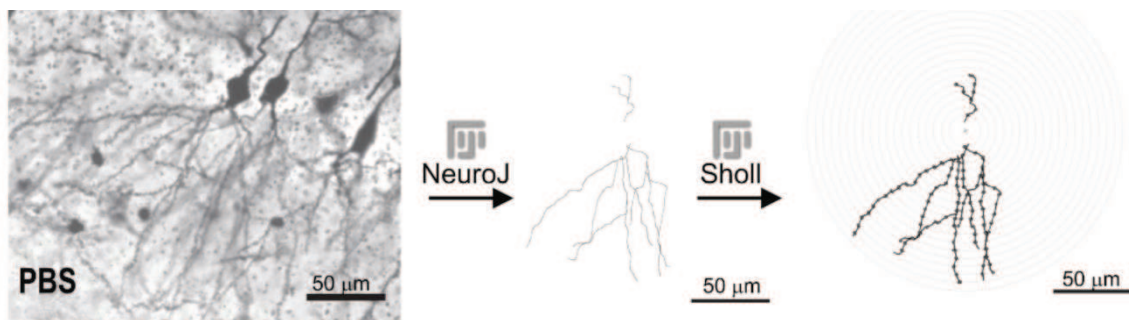


Figura 14. Análisis del árbol dendrítico mediante análisis de Sholl. Imagen representativa de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo teñidas con Golgi-Cox de un ratón tratado con PBS y sometidas a trazado con NeuroJ para medir la longitud dendrítica total. Barra de escala: 50 μm .

3.18. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando GraphPad Prism 5.0, y los datos graficados se expresaron como media \pm desviación estándar (SD, del inglés *Standard Deviation*) o como media \pm error estándar de la media (SEM, del inglés *Standard Error of the Mean*) según se indica en cada figura. Todos los resultados fueron estadísticamente evaluados considerando los siguientes grados: ns, no significativo o significancia * cuando $p < 0.05$; ** cuando $p < 0.01$; *** cuando $p < 0.001$ y **** cuando $p < 0.0001$.

Las diferencias estadísticas en el contenido de AS fueron evaluadas mediante la prueba t de Student. Se utilizó la simbología * para señalar diferencias significativas en la comparación entre rhEPO y las muteínas producidas por ambos linajes celulares, mientras que para la comparación de una misma muteína frente a su análogo expresado en la otra línea celular se utilizó la simbología #.

Las diferencias estadísticas entre los tratamientos con rhEPO o las muteínas frente al control negativo (PBS) en los ensayos de neuritogénesis, formación de filopodios y sinaptogénesis se analizaron mediante ANOVA de una vía, seguido de la prueba *post hoc* de Bonferroni.

Los resultados obtenidos en la actividad neurobiológica *in vivo* fueron analizados por medio de ANOVA de dos vías. Se utilizó la simbología * para evidenciar diferencias significativas entre rhEPO y las muteínas respecto del grupo control (PBS), mientras que para las comparaciones entre rhEPO y sus variantes se utilizó la simbología #.

Las diferencias estadísticas en los parámetros farmacocinéticos se evaluaron mediante la prueba no paramétrica de Mann–Whitney, comparando cada muteína con rhEPO. También se realizó la comparación de cada muteína frente a su análogo expresado en la otra línea celular.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de esta tesis se organizaron en dos secciones: la primera, desarrolla los resultados de los experimentos realizados para el cumplimiento del primer objetivo específico planteado, es decir, la caracterización de las nuevas variantes de hEPO producidas a partir de las líneas recombinantes CHO previamente generadas en nuestro laboratorio. Se abordan experimentos que detallan la producción en condiciones de adherencia y la purificación mediante CIA. Asimismo, se describen los resultados obtenidos para la caracterización fisicoquímica y biológica *in vitro* de las proteínas puras. Esta primera etapa posibilitó, por un lado, realizar una caracterización preliminar de las variantes hiperglicosiladas de hEPO que hasta el momento no habían sido evaluadas y, por otro lado, seleccionar aquellas que presentan potencial para un estudio más completo que incluye el análisis de la expresión en un hospedador diferente.

El criterio de selección y/o exclusión de muteínas candidatas se basó en los resultados relacionados con la estabilidad estructural y los estudios *in vitro* de la actividad eritropoyética y neurobiológica.

La segunda sección de la presente tesis hace referencia a los objetivos específicos 2 y 3. En ella se detalla la generación de las muteínas hiperglicosiladas de hEPO que fueron seleccionadas para ser expresadas en la línea celular HEK. De esta manera, se describen los resultados asociados a la generación de las líneas celulares, la producción de las nuevas variantes en condiciones de adherencia y la etapa de purificación, teniendo en cuenta aspectos evaluados en la primera parte. En el desarrollo de esta sección, se realizó la comparación de las variantes producidas en las distintas líneas celulares con relación al contenido glicosídico, propiedades farmacocinéticas y actividad biológica evaluada tanto *in vitro* como *in vivo*.

4.1. Producción, purificación, caracterización fisicoquímica y biológica *in vitro* de variantes expresadas en células CHO

4.1.1. Producción de las variantes hiperglicosiladas de hEPO

Las líneas celulares productoras de las variantes de hEPO previamente obtenidas en el laboratorio fueron revitalizadas y amplificadas para proceder a la producción en condiciones de adherencia utilizando frascos T de 175 cm². Cada 48 o 72 h se realizó un recambio del medio de producción y se recolectaron las distintas cosechas de sobrenadante de cultivo que contenían la proteína de interés. La concentración de las cosechas se evaluó por ES indirecto (sección 3.12.1). La utilización como anticuerpo de captura del mAb 2B2 resultó apropiada ya que fue capaz de reconocer e interactuar con todas las muteínas.

La Tabla 3 resume el número de cosechas obtenidas, la concentración promedio de la proteína de interés en cada una de ellas y la masa total obtenida de cada muteína.

Tabla 3. Cuantificación de las cosechas conteniendo las variantes hiperglicosiladas de hEPO producidas en células CHO

Variante	Número de cosechas	Concentración promedio (µg.mL ⁻¹)	Masa acumulada (mg)
Mut 15_17	15	3	7
Mut 45_47	8	12	10
Mut 62_64	8	20	16
Mut 65_67	8	108	112
Mut 72_74	8	42	33
Mut 76_78	10	145	217
Mut 98_100	10	11	15
Mut 104	10	11	15
Mut 106_108	10	20	26
Mut 149	8	32	39
Mut 151_153	10	13	17

Durante la etapa de producción se obtuvieron entre 8 y 10 cosechas de cada variante, excepto para la Mut 15_17 que, dada su menor productividad, se extendió hasta disponer de 15 cosechas de cultivo. Particularmente, las concentraciones obtenidas para las líneas

celulares productoras de Mut 65_67 y Mut 76_78 resultaron notablemente superiores respecto del resto de las otras líneas recombinantes; esto podría deberse a una sobreestimación de su concentración por ELISA, por diferencias a nivel del reconocimiento que el anticuerpo de captura (mAb 2B2) ejerce entre el estándar (rhEPO) y las variantes. Resulta importante destacar que no se realizó la producción de la variante Mut 49 ya que esta variante conservó la totalidad de la actividad eritropoyética *in vitro*, evaluada de forma preliminar.

Las masas totales obtenidas para cada muteína fueron suficientes para proceder a su purificación con el objetivo de obtener un único lote de cada variante que permita llevar a cabo la totalidad de los estudios posteriores.

4.1.2. Purificación de las variantes hiperglicosiladas de hEPO por CIA

4.1.2.1. Evaluación de la capacidad eluyente de distintas soluciones

Con el objetivo de evaluar la mejor condición de elución para los procesos de purificación de las variantes de hEPO se realizaron ensayos de ES para simular la interacción que ocurre en una matriz cromatográfica. Se cuantificó la proporción de las variantes de hEPO que permanecieron unidas luego de someterlas al efecto eluyente de distintas soluciones. Como control del ensayo se empleó PBS y se lo consideró como la solución que no produjo desorción de la muteína unida al mAb 2B2; es decir, la condición que preserva la totalidad de la proteína retenida. La Figura 15 muestra el resultado obtenido para las Mut 149 y Mut 65_67 a modo de ejemplo. No obstante, los resultados obtenidos para las otras variantes fueron muy similares.

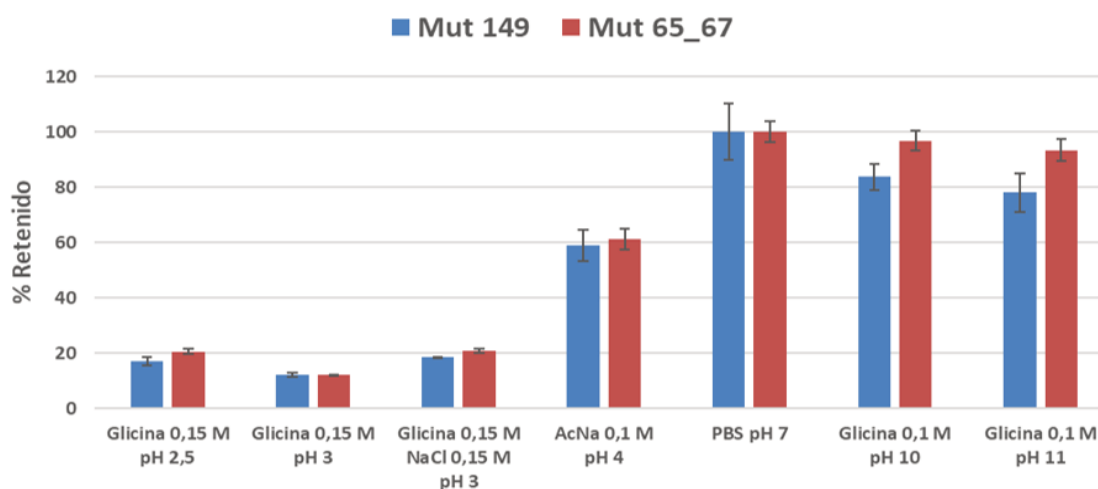


Figura 15. Evaluación de la capacidad eluyente de distintas soluciones. Se graficó en eje de ordenadas el % retenido por el mAb 2B2 luego de la incubación con cada solución en función de la solución correspondiente en eje de abscisas.

4.1.2.2 Generación de matrices de IA

Con el objetivo de disponer de matrices de IA para la purificación de las variantes de hEPO, se realizó la producción del mAb 2B2 en condición de suspensión, a partir de su hibridoma. De este modo, la masa total producida fue aproximadamente de 400 mg de mAb 2B2. El mismo se purificó mediante cromatografía de afinidad a proteína A siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.13.1.1. La Figura 16 muestra el cromatograma obtenido en una de las reiteraciones del proceso.

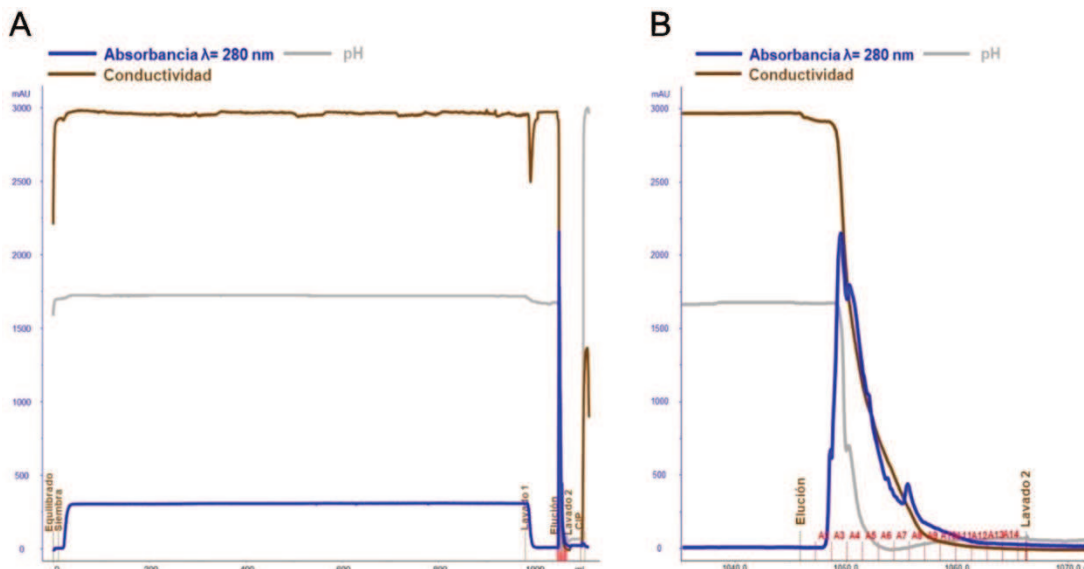


Figura 16. Purificación de mAb 2B2 por cromatografía de afinidad a proteína A. En los cromatogramas se representan las señales de absorbancia $\lambda=280$ nm (azul), pH (gris) y conductividad (marrón) en función del volumen de elución. (A) Proceso cromatográfico completo. (B) Etapa de elución ampliada. En esta última etapa se indican las fracciones recolectadas (rojo).

El aumento de la señal de absorbancia a $\lambda=280$ nm en la etapa de elución corresponde a la desorción del mAb 2B2. Como puede apreciarse en el cromatograma, el pico de elución se obtuvo entre las fracciones 2 y 9, observándose un efecto de *tailing* hasta el retorno a la absorbancia correspondiente a la línea de base generada por la absorbancia de la solución de elución. La recuperación se evaluó mediante ES, no detectándose pérdida del anticuerpo en el FT y durante los lavados, demostrando que la capacidad de la matriz cromatográfica no fue excedida con la masa ofrecida. La elución del anticuerpo se concentró fundamentalmente entre las fracciones 2 y 3, recuperándose la totalidad del anticuerpo sembrado (aproximadamente 25 mg). Posteriormente, el grado de pureza de los eluatos fue evaluado mediante SDS-PAGE.

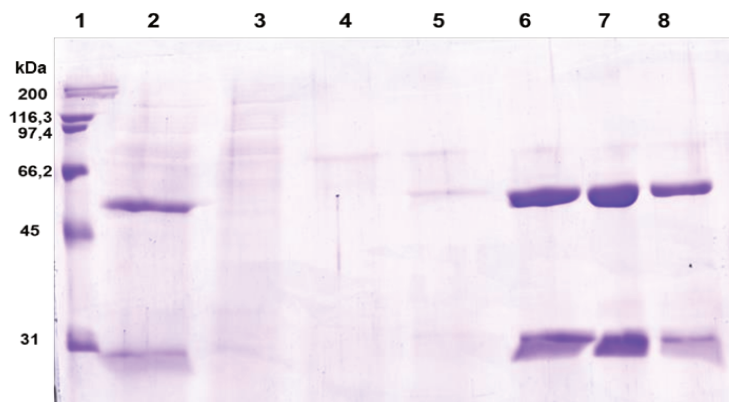


Figura 17. Purificación del mAb 2B2 mediante cromatografía de afinidad de proteína A. Evaluación de pureza mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras. Calle 1, MMM, calle 2, muestra sembrada; calle 3, FT; calle 4, lavado 1; calle 5, lavado 3; calle 6 fracción de elución E2; calle 7, fracción de elución E3; calle 8, fracción de elución E4.

Dado que el hibridoma fue cultivado en un medio libre de SFB (medio Excell-620), el sobrenadante de su cultivo tiene una pureza elevada (aproximadamente 81%) tal como se observa en la Figura 17, donde se visualizan dos bandas mayoritarias identificadas como cadenas pesadas (~55 kDa) y livianas (~25 kDa). Las restantes calles correspondientes al FT y los lavados no exhibieron pérdida de anticuerpo pero evidencian la presencia de otras bandas proteicas débilmente teñidas que son propias del cultivo de hibridomas y del medio de cultivo utilizado (el que presenta en su formulación original una baja concentración proteica: $11 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). El análisis por densitometría de bandas coloreadas demostró un grado de pureza en los eluatos del 96,5%, lo que resulta un valor de pureza adecuado para la preparación de matrices de IA.

Por otro lado, se confirmó la funcionalidad del mAb 2B2 en su capacidad para interaccionar con rhEPO luego del procedimiento de purificación mediante CIA (para ello se utilizó un ELISA específico indirecto). Posteriormente, los eluatos se dializaron con solución de acoplamiento para su inmovilización en la resina de *Sepharose*. Para garantizar el correcto acoplamiento del anticuerpo a la matriz cromatográfica, se determinó la concentración del mAb por absorbancia a $\lambda=280 \text{ nm}$ en la solución previa y posterior a la reacción de acoplamiento. De este modo, se confirmó un porcentaje de acoplamiento superior al 95%. El total de la matriz preparada fue dividido para contar con resinas independientes para la purificación de cada variante.

4.1.3. Purificación de las variantes de hEPO empleando la matriz de IA Sepharose-mAb 2B2

Para cada molécula se llevaron a cabo entre 6 y 12 ciclos de purificación. La masa sembrada fue calculada a partir de las concentraciones de las cosechas, considerando la capacidad teórica de la matriz. La Figura 18 muestra ejemplos de los cromatogramas obtenidos durante un ciclo de purificación de cada variante.

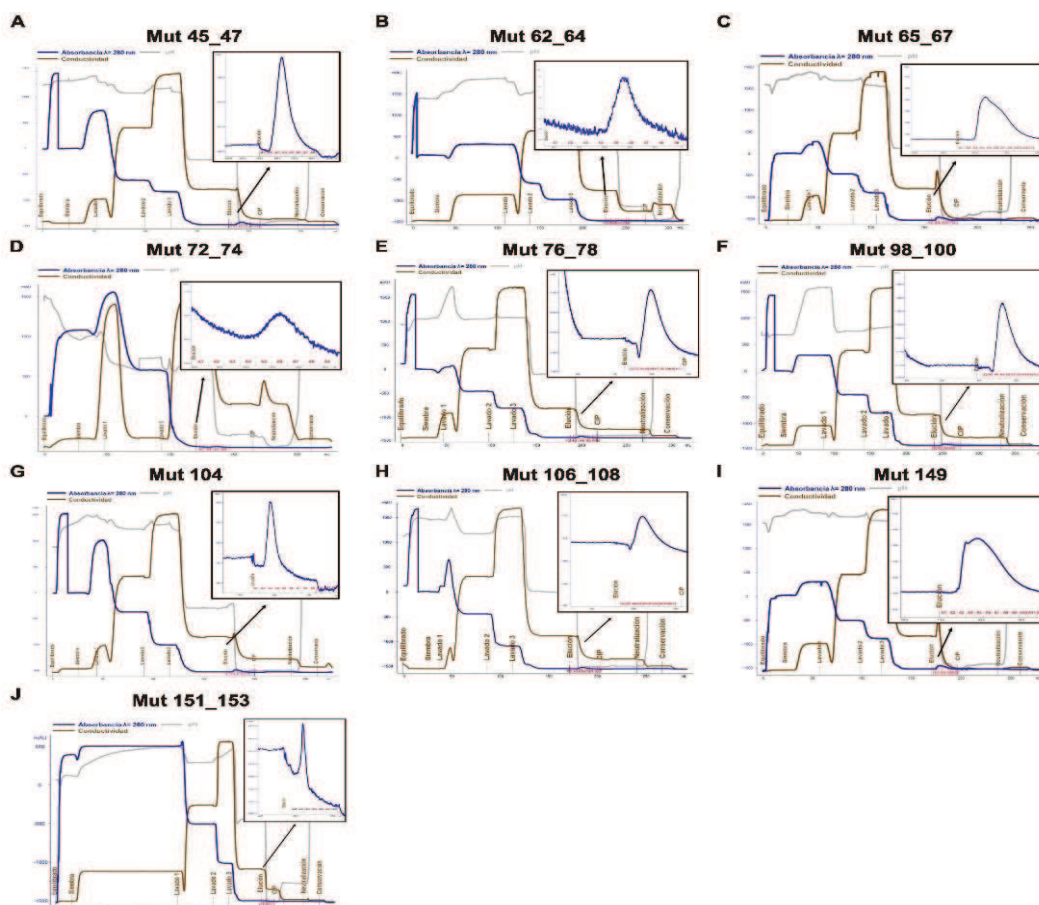


Figura 18. Purificación de cada muteína mediante CIA. Se muestran los cromatogramas correspondientes a la purificación de las muteínas: Mut 45_47 (A), Mut 62_64 (B), Mut 65_67 (C), Mut 72_74 (D), Mut 76_78 (E), Mut 98_100 (F), Mut 104 (G), Mut 106_108 (H), Mut 149 (I) y Mut 151_153 (J). En los cromatogramas se representan las señales de absorbancia $\lambda=280$ nm (azul), pH (gris) y conductividad (marrón) en función del volumen de elución. Mediante líneas perpendiculares al eje de abscisas se indica el inicio de cada una de las etapas del proceso cromatográfico. En el recuadro superior derecho de cada figura se muestra una ampliación del pico de elución, indicándose las fracciones recolectadas (rojo). Es importante destacar que se muestran los cromatogramas de 10 de las 12 muteínas puesto que no fue posible la purificación de la Mut 15_17 como se describe en el manuscrito ni se llevó a cabo la producción de la Mut 49 por conservar la totalidad de la AE evaluada *in vitro*. Para una visualización detallada de las señales de detección y de las partes de los cromatogramas, cada uno de ellos fue reiterado en forma ampliada, constituyendo la Figura A1 de la sección 6. ANEXO (a partir de la página 141).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La señal de elución correspondiente a todas las variantes purificadas se obtuvo entre las fracciones 4 y 8, equivalentes a los VC 2 a 4, respectivamente.

El rendimiento de los procesos de purificación fue evaluado mediante ES. La Tabla 4 resume los porcentajes de recuperación promedio para cada variante.

Tabla 4. Resumen de la purificación por CIA de las variantes de hEPO

Variante	N° ciclos de CIA	Rendimiento promedio* (%)	Pureza (%)
Mut 45_47	10	49	92
Mut 62_64	10	35	84
Mut 65_67	8	46	95
Mut 72_74	12	14	89
Mut 76_78	10	33	88
Mut 98_100	10	35	88
Mut 104	8	54	96
Mut 106_108	6	56	93
Mut 149	9	29	96
Mut 151_153	10	55	89

* El rendimiento promedio hace referencia a la recuperación porcentual obtenida durante la etapa de elución.

Cabe destacar que no se observaron pérdidas considerables de las muteínas en las etapas de FT o lavados, por lo que la afinidad del anticuerpo no se vio comprometida por la solución de elución elegida a lo largo de los distintos ciclos cromatográficos.

Particularmente, con respecto a la variante Mut 15_17, los estudios previos realizados en la evaluación de la capacidad eluyente de distintas soluciones habían demostrado una baja recuperación de dicha variante, ya que al utilizar las soluciones candidatas de condición de elución el porcentaje de proteína retenida superó el 80% en todos los casos. No obstante, se realizó un ciclo de purificación a modo de prueba con la solución de elución seleccionada para el resto de las muteínas en el que la proteína no logró su desorción de la matriz cromatográfica (recuperación inferior al 15%). A pesar de que la proteína no pudo ser obtenida en cantidad suficiente para llevar a cabo el análisis de la estabilidad térmica como

acercamiento al conocimiento de su estructura terciaria, concluimos que la muteína puede exhibir una conformación que la expone a interacciones inespecíficas con la matriz que impiden la elución de la misma. Por este motivo, se decidió no continuar con su estudio.

En general, se observaron recuperaciones por debajo del 56% para todas las variantes purificadas, lo cual es un indicio de una fuerte interacción entre el mAb 2B2 y su epítopo. Considerando que todas las variantes exhibieron una baja recuperación durante el proceso de su purificación, es evidente que las modificaciones moleculares llevadas a cabo por glicoingeniería no afectaron la capacidad de unión al anticuerpo.

Las fracciones de elución correspondientes a todos los ciclos cromatográficos de una misma variante fueron agrupadas y sometidas al proceso de diafiltración empleando PBS hasta concentrarlas en promedio 200 veces. Posteriormente, la pureza de los eluatos concentrados fue evaluada mediante SDS-PAGE seguido de tinción con colorante azul brillante de *Coomassie* y posterior densitometría de bandas. En la Tabla 4 se resumen los resultados obtenidos luego del proceso de purificación de las variantes de hEPO.

Como principales proteínas contaminantes se observaron 3 bandas de MM aparentes de aproximadamente 66, 50 y 25 kDa (Figura 19). La primera de estas, probablemente, se corresponde con la BSA proveniente del SFB utilizado para el suplemento del medio de cultivo, mientras que las bandas restantes coinciden con las MM de las cadenas pesada y liviana del mAb 2B2, que coeluiría con la proteína de interés. No obstante, los valores de pureza en todos los casos fueron superiores al 84%, los que resultan elevados por tratarse de un único paso de purificación. De este modo, el proceso de purificación por IA fue considerado apropiado para continuar con la caracterización de las muteínas.

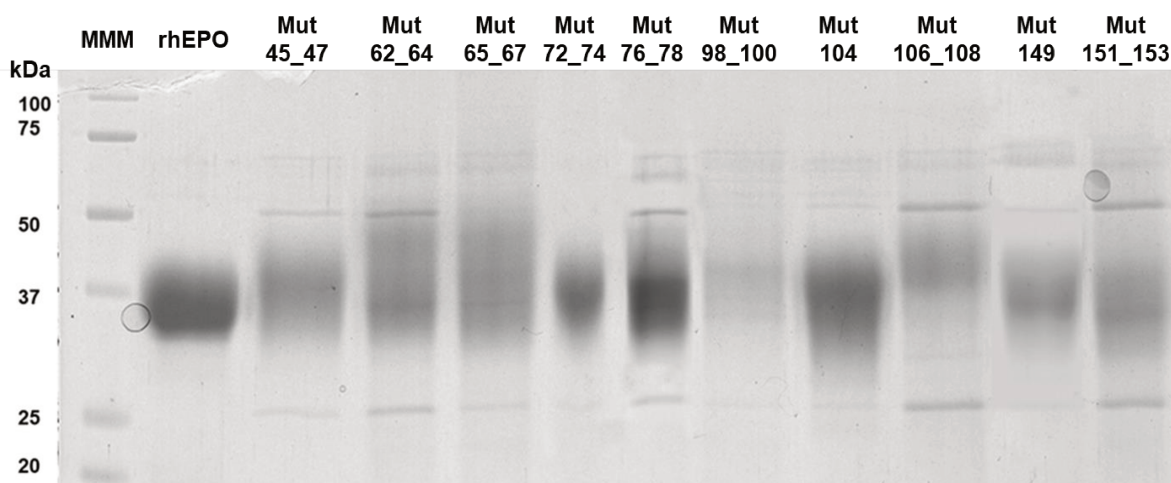


Figura 19. Evaluación de los perfiles de MM aparente de las muteínas de hEPO. En la parte superior se indican los carriles de siembra correspondientes a los MMM (marcador de MM), rhEPO y a las diferentes muteínas producidas en células CHO.K1.

4.1.4. Caracterización fisicoquímica

4.1.4.1. Evaluación de las MM aparentes

La evaluación de los perfiles de MM aparente de las variantes purificadas fue realizada mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras, seguido de tinción con colorante azul brillante de *Coomassie* (Figura 19).

Las muteínas de hEPO exhibieron MM aparentes superiores con respecto a la molécula sin modificar (Figura 19). Considerando que los aminoácidos reemplazados en la molécula original no representan un cambio significativo en la MM teórica de la proteína, la diferencia observada se debe a la incorporación de la cadena de N-glicano a partir del nuevo sitio generado por las mutaciones puntuales introducidas sobre las variantes de hEPO. Esto representa una primera instancia que permite concluir en el éxito de la estrategia de glicoingeniería. Utilizando los MMM como referencia, se calcularon los rangos de MM para cada variante, listados a continuación:

Tabla 5. MM aparentes determinadas para cada proteína

Variante	Rango de MM (kDa)
rhEPO	33-45
Mut 45_47	33-50
Mut 62_64	33-50
Mut 65_67	32-53
Mut 72_74	33-47
Mut 76_78	32-49
Mut 98_100	34-45
Mut 104	28-48
Mut 106_108	39-49
Mut 149	33-48
Mut 151_153	31-47

El límite inferior de los rangos de MM calculados para las variantes resultó similar al de la molécula de rhEPO original, excepto para Mut 104 que podría contener isoformas menos

glicosiladas que condicionan un menor radio hidrodinámico. Asimismo, se observaron discrepancias en la MM aparente máxima, probablemente como consecuencia de la presencia de isoformas con diferente complejidad en sus glicanos y/o en el contenido de ácido siálico.

4.1.4.2. Análisis de la estabilidad térmica

Se utilizó la técnica de *Thermal Shift* para evaluar la estabilidad térmica de rhEPO y de sus variantes, con el objetivo de analizar si los cambios introducidos podían alterar la estabilidad de la proteína y su estructura. Para ello, se realizó un ajuste no lineal de las intensidades de fluorescencia emitidas en un determinado rango de temperaturas para determinar la T_M de cada variante (Figura 20).

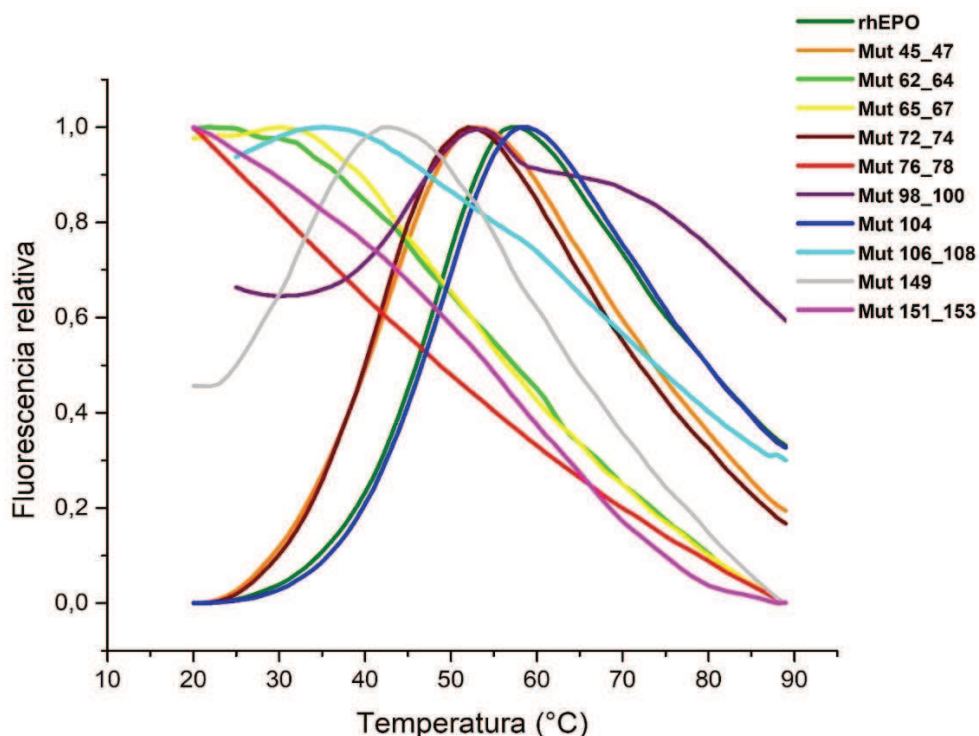


Figura 20. Análisis de la desnaturalización térmica de rhEPO y de sus variantes. En el eje de ordenadas se representan las intensidades de fluorescencia relativas en función de la temperatura.

Este estudio permitió identificar, por un lado, muestras que exhibieron una transición del estado plegado al desplegado de forma cooperativa. Este comportamiento se debe a la naturaleza de la sonda fluorescente utilizada. A 20 °C la misma se une a regiones hidrofóbicas de la proteína que no están expuestas, exhibiendo una baja señal de fluorescencia. Como consecuencia del aumento de temperatura, se favorece el proceso de

desnaturalización, incrementando la exposición de las regiones hidrofóbicas y, consecuentemente, la intensidad de fluorescencia hasta un máximo de emisión. A temperaturas superiores, la señal decae como consecuencia de la ruptura del complejo sonda-proteína.

Por otro lado, se observaron variantes de hEPO que no mostraron una transición cooperativa del estado plegado al desplegado, sino que solo exhibieron curvas con pendiente decreciente. En este caso, la intensidad de fluorescencia inicial resultó superior debido a que estas proteínas a 20 °C poseen regiones hidrofóbicas expuestas y luego, a medida que aumenta la temperatura, disminuye la fluorescencia como consecuencia de la disociación sonda-proteína. Este comportamiento permite inferir que este grupo de proteínas se encuentra en un estado inicial desplegado y, por ello, no ocurre un aumento de fluorescencia con la temperatura.

A partir del ajuste no lineal de las curvas de intensidad de fluorescencia en función de la temperatura se calculó la T_M de rhEPO y de sus variantes, que corresponde a la temperatura a la cual el 50% de la proteína se encuentra en estado desplegado (Tabla 6).

Tabla 6. Temperatura de fusión de rhEPO y de sus variantes

Variante	T_M (°C)
rhEPO	50,5±0,4
Mut 45_47	45,3±0,4
Mut 62_64	N/D
Mut 65_67	N/D
Mut 72_74	44,5±0,1
Mut 76_78	N/D
Mut 98_100	45,3±0,6
Mut 104	52,5±1,3
Mut 106_108	35,0±0,1
Mut 149	35,4±0,5
Mut 151_153	N/D

N/D: no fue posible su determinación durante su evaluación experimental.

T_M : temperatura de fusión

De este modo, se pudo calcular una T_M para las variantes Mut 45_47, Mut 72_74, Mut 98_100, Mut 104, Mut 106_108 y Mut 149, lo que sugiere que la estructura terciaria de las mismas no se vio fuertemente alterada como consecuencia de la modificación realizada al introducir el sitio adicional de N-glicosilación.

En contraposición, la T_M de las variantes Mut 62_64, Mut 65_67, Mut 76_78 y Mut 151_153 no pudo ser determinada debido a que las proteínas no exhibieron una transición cooperativa de plegado/desplegado. Estos resultados sugieren que la estructura terciaria de las variantes se encuentra comprometida. Es importante destacar que las modificaciones realizadas en este grupo de muteínas con respecto a la molécula original coinciden con regiones estructurales de hélices alfa, que corresponden a plegamientos proteicos altamente estables y que admiten poca variación, por lo que pequeñas modificaciones pueden provocar la disrupción de este plegamiento y afectar la estructura terciaria de la proteína. En concordancia con estos resultados, los elevados valores de concentración de muteínas obtenidos previamente para las cosechas de las Mut 65_67 y Mut 76_78 podrían estar relacionados con el aumento del estado desplegado del polipéptido, provocando una mayor captación por los anticuerpos utilizados en la técnica de ES indirecto.

Dada la naturaleza desplegada de todas estas variantes, los estudios posteriores relacionados con la expresión de tales muteínas en células HEK-293 fueron discontinuados. Finalmente, si bien las Mut 106_108 y Mut 149 mostraron una transición cooperativa plegado/desplegado, sus T_M resultaron considerablemente menores con respecto a rhEPO, por lo que se puede esperar que su estructura terciaria se encuentre parcialmente alterada. Teniendo en cuenta, además, que la T_M de estas muteínas es inferior a la temperatura fisiológica, también fueron discontinuadas para estudios posteriores, ya que al pensarlas como candidatos terapéuticos podrían alterarse rápidamente al ser administradas, perdiendo su capacidad terapéutica.

Es importante aclarar que, con el fin de determinar si las modificaciones introducidas afectaban la estructura secundaria y/o terciaria de la proteína y si la realización de estudios de TS eran adecuados para evaluar la pérdida de conformación de las muteínas, se realizaron estudios de dicroísmo circular (DC) en las regiones de UV cercano y lejano para las variantes Mut 45_47, Mut 104 y Mut 151_153 y comparadas frente a la rhEPO (Figura 21).

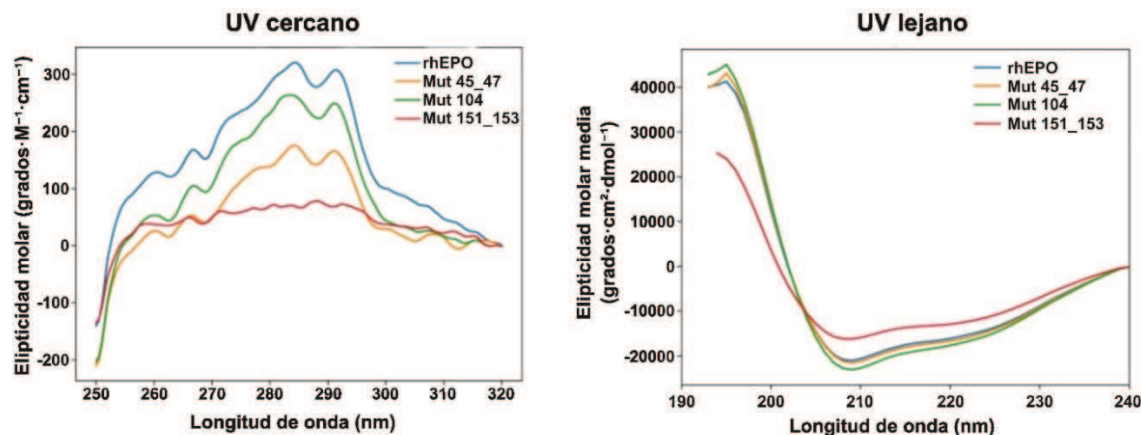


Figura 21. Espectros de DC (UV cercano y lejano) de rhEPO y Mut 45_47, 104 y 151_153. En eje de ordenadas se graficó la elipticidad molar calculada a partir de los datos experimentales en función de las longitudes de onda en las correspondientes regiona de UV cercano y lejano.

En particular, los espectros de DC de UV cercano y lejano indicaron que la variante Mut 151_153 adopta un estado de tipo glóbulo fundido, con conservación parcial de la estructura secundaria, pero sin un núcleo hidrofóbico estable ni estructura terciaria definida. De manera consistente con el ensayo de TS, esta variante no presentó una transición de desnaturalización cooperativa, por lo que no fue posible determinar un valor de T_M , confirmando que la proteína se encuentra en un estado desplegado o parcialmente plegado. En contraste, las variantes 45_47 y 104 mostraron espectros de DC compatibles con estructuras secundarias y terciarias comparables a las de la rhEPO no modificada. Los ensayos de TS también evidenciaron transiciones de desnaturalización cooperativas bien definidas en estas muestras, permitiendo la determinación confiable de las T_M , que resultaron muy similares entre ellas.

Considerando las variantes que fueron estudiadas mediante ambas técnicas, los resultados de TS mostraron una clara concordancia con los obtenidos mediante DC, lo que respalda la solidez de los primeros para el análisis comparativo de la estabilidad estructural y, de este modo, avala los resultados obtenidos para el resto de las muteínas evaluadas únicamente por TS.

4.1.5. Evaluación *in vitro* de la actividad biológica

4.1.5.1. Evaluación de la actividad eritropoyética

Con el objetivo de confirmar si la incorporación de la cadena de N-glicano bloquea efectivamente la AE, la misma se evaluó *in vitro* para las variantes purificadas, empleando la línea celular UT-7, que requiere de rhEPO para su proliferación [142].

A partir de la medición experimental de la AE y conociendo la concentración de cada muteína en la muestra analizada se calculó la actividad eritropoyética específica (AEE) como el cociente de cada determinación. Luego, se determinó un porcentaje de inhibición de la AEE de las muteínas purificadas mediante su comparación con la AEE de la rhEPO considerada como 100%. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7. Evaluación de AE *in vitro*

Variante	AEE (%)
rhEPO	100
Mut 45_47	0
Mut 62_64	2
Mut 65_67	18
Mut 72_74	40
Mut 76_78	0
Mut 98_100	12
Mut 104	0
Mut 106_108	14
Mut 149	36
Mut 151_153	0

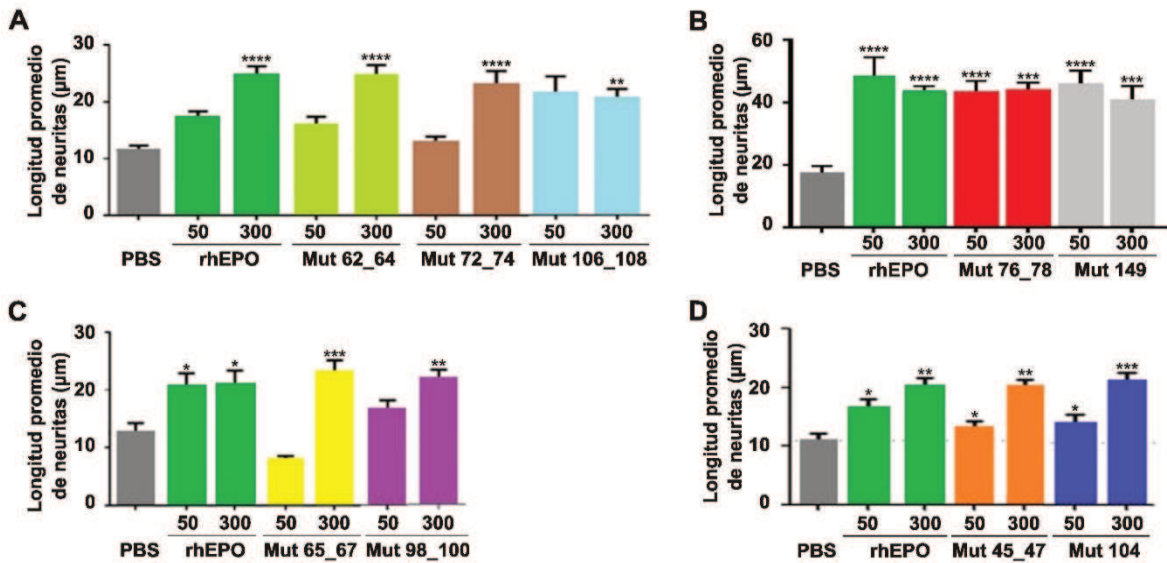
Todas las variantes evaluadas exhibieron una considerable disminución en la AEE *in vitro*. Particularmente, la Mut 72_74 exhibió un menor porcentaje de inhibición, probablemente debido a que las mutaciones introducidas están ubicadas en la región asociada a la actividad citoprotectora descrita por Brines y col. [57], por lo que es de esperar que la inhibición sea menor respecto de aquellas variantes en las cuales se sustituyeron residuos ubicados en las regiones de unión al receptor homodimérico de hEPO. Por esta razón, la misma no fue incluida para ser evaluada en los estudios posteriores relacionados con la expresión de las muteína en células HEK-293.

Las variantes Mut 98_100 y Mut 106_108 exhibieron un porcentaje de inhibición notablemente superior con respecto a la Mut 72_74, como consecuencia de que las modificaciones se encuentran en la región perteneciente al sitio de unión al receptor de baja afinidad, por lo que es de esperar que la AEE se encuentre disminuida, mientras que la actividad neurobiológica permanezca inalterada. Aunque la AEE *in vitro* se redujo significativamente, la preservación de un pequeño porcentaje de esta actividad podría manifestarse *in vivo*, ya que el accionar eritropoyético *in vivo* es fuertemente dependiente de la mejora en las propiedades PK, accionar que se vería ampliamente favorecido por el incremento del contenido de glicanos. Por estos motivos, ambas variantes también fueron descartadas para su continuidad con estudios posteriores correspondientes a la expresión en células HEK-293.

4.1.5.2. Evaluación de la actividad neuroplástica

La AN *in vitro* fue evaluada de manera preliminar, a través del estudio de la neuritogénesis, de modo de seleccionar los candidatos más interesantes en término no sólo de sus propiedades fisicoquímicas sino también biológicas.

Para la evaluación de la neuritogénesis se incubaron células N2a con diferentes concentraciones de rhEPO o de las variantes en ausencia de SFB y se comparó con las mismas células tratadas con PBS. Se cuantificó la longitud promedio de neuritas y el promedio de la neurita más larga por célula en cada condición.



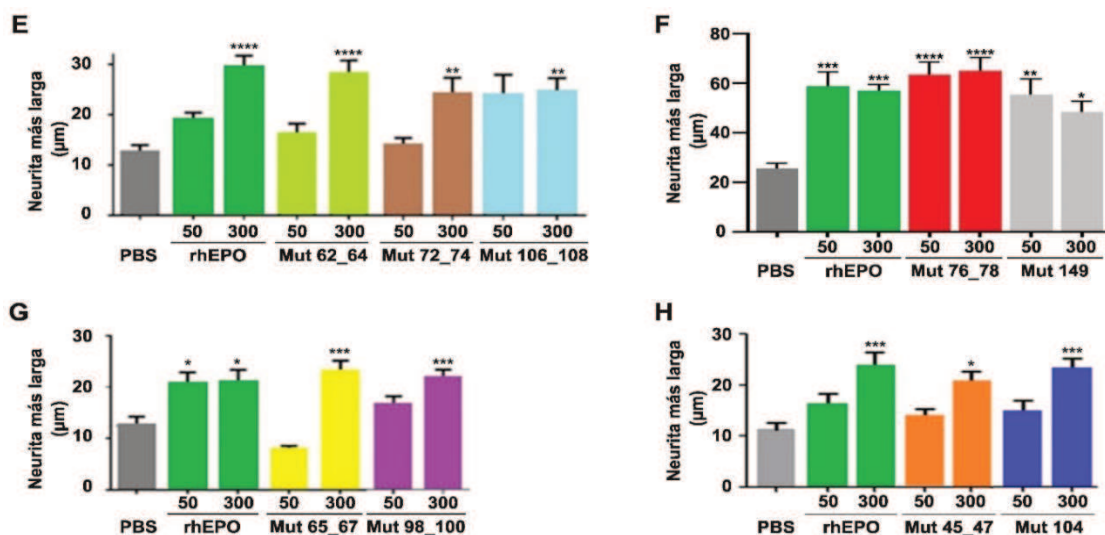


Figura 22. Evaluación de neuritogénesis *in vitro*. Cuantificación de longitud promedio de neuritas de (A) Mut 62_64, Mut 72_74 y Mut 106_108; (B) Mut 76_78 y Mut 149; (C) Mut 65_67 y Mut 98_100 y (D) Mut 45_47 y Mut 104. Cuantificación de la neurita más larga por célula de (E) Mut 62_64, Mut 72_74 y Mut 106_108; (F) Mut 76_78 y Mut 149; (G) Mut 65_67 y Mut 98_100 y (H) Mut 45_47 y Mut 104. En el eje de ordenadas se graficó la longitud promedio de neuritas en función de cada variante en eje de abscisas. Los resultados se expresan como media \pm SEM ($n > 25$ células). Prueba estadística de ANOVA de una vía con corrección de Bonferroni de rhEPO (control positivo) o muteínas frente a control negativo (PBS) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

A partir del análisis estadístico, se observó que todas las variantes evaluadas fueron capaces de estimular la elongación de neuritas en los precursores neuronales al ser administradas en una dosis de 300 ng.mL^{-1} confirmando la conservación de la actividad neuroplástica de hEPO.

Asimismo, se obtuvo una respuesta dosis-dependiente de todas las variantes (excepto para Mut 76_78, Mut 106_108 y Mut 149), aunque las pruebas estadísticas realizadas no evidenciaron diferencias significativas en los tratamientos con las concentraciones de 50 ng.mL^{-1} .

Teniendo en cuenta que las variantes Mut 62_64, Mut 65_67 y Mut 72_74 forman parte del grupo control de variantes cuyas mutaciones fueron realizadas en la región asociada a la actividad citoprotectora, puede concluirse que las modificaciones introducidas no lograron bloquear completamente esta actividad. No obstante, tanto para Mut 72_74 como para Mut 65_67 se registraron valores visiblemente menores en los tratamientos a dosis de 50 ng.mL^{-1} con respecto a rhEPO, lo que sugiere una disminución parcial de la AN.

La Tabla 8 resume la caracterización fisicoquímica y biológica de las muteínas de hEPO. En la columna correspondiente a la estructura terciaria se consigna si cada muteína se encuentra plegada o desplegada, según lo inferido a partir de los perfiles de TS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 8. Caracterización fisicoquímica y biológica de muteínas de hEPO

Variante	MM (kDa)	AEE _{SN} [*] (%)	AEE _{pp} ^{**} (%)	AN	T _M (°C)	Estructura terciaria ^{***}	Observaciones
Mut 15_17	N/D	0	N/D	N/D	N/D	N/D	Discontinuada debido a la imposibilidad de su purificación
Mut 45_47	33-50	0,2	0	Preservada	45,3±0,4	Plegada	
Mut 49	N/D	100	N/D	N/D	N/D	N/D	Discontinuada debido a la preservación de la AE en SN
Mut 62_64	33-50	0,2	2	Preservada	N/D	Desplegada	
Mut 65_67	32-53	0,5	18	Preservada	N/D	Desplegada	
Mut 72_74	33-47	0	40	Preservada	44,5±0,1	Plegada	
Mut 76_78	32-49	0	0	Preservada	N/D	Desplegada	
Mut 98_100	34-45	0,1	12	Preservada	45,3±0,6	Plegada	
Mut 104	28-48	0	0	Preservada	52,5±1,3	Plegada	
Mut 106_108	39-49	0	14	Preservada	35,0±0,1	Plegada	
Mut 149	33-48	0,7	36	Preservada	35,4±0,5	Plegada	
Mut 151_153	31-47	0	0	Preservada	N/D	Desplegada	

^{*}AEE SN refiere a la inhibición de la AEE de cada variante evaluada a partir del sobrenadante de cultivo durante la etapa de producción. De igual manera que la AEE_{pp} (^{**}que se refiere a la AEE de las proteínas purificadas), se expresó como porcentaje de la AEE de rhEPO.

^{***}El estado de la estructura terciaria fue estimado a partir de la determinación de la T_M.

N/D: no determinado porque la proteína no fue purificada o porque la proteína demostró un estado desplegado que imposibilitó su cálculo.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos durante la primera parte del desarrollo del trabajo de tesis, las variantes Mut 45_47 y Mut 104 fueron seleccionadas para su expresión en la línea celular HEK-293, mientras que las demás variantes no fueron incluidas en los estudios realizados a partir de la siguiente sección.

4.2. Generación, producción, purificación, caracterización fisicoquímica y biológica *in vitro* e *in vivo* de variantes expresadas en células HEK. Comparación con sus análogos expresados en células CHO

4.2.1. Desarrollo de líneas celulares recombinantes

Las líneas celulares HEK recombinantes estables, productoras de cada una de las variantes hiperglicosiladas de hEPO, fueron desarrolladas por transducción a partir de PLV. Para ello, el plásmido codificante de cada una de las variantes se amplificó a partir de sus respectivas bacterias recombinantes. La integridad de los plásmidos obtenidos fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa.

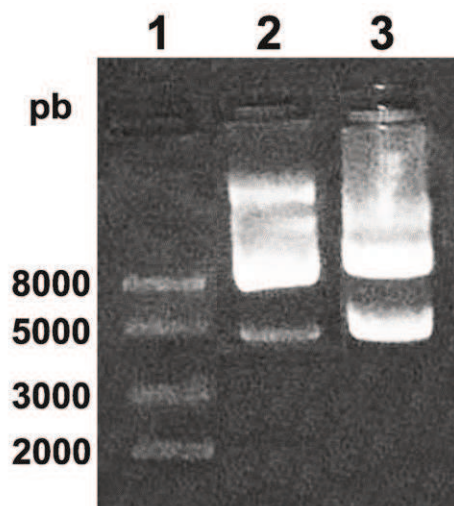


Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa de los vectores pLV-pLK-Mut EPO. Calle 1, MMM (expresado en pares de bases, pb); calle 2, pLV-pLK-Mut 45_47; calle 3, pLV-pLK-Mut 104.

La Figura 23 muestra los perfiles electroforéticos de los vectores amplificados. En todos ellos se observa una banda de MM superior a 8000 pb, que coincide con el tamaño esperado de aproximadamente 8200 pb del vector pLV-pLK-MutX. Además, en las 2 calles correspondientes a las muteínas de hEPO se observa la presencia de una banda adicional de masa 5000 pb correspondiente a la conformación superenrollada del vector plasmídico previamente mencionado. Esta conformación se caracteriza por un alto grado de compactación, exhibiendo una mayor movilidad electroforética en comparación con sus

formas relajada y lineal, desplazándose más rápidamente a través del gel. Es pertinente señalar que no se observaron bandas difusas de baja MM correspondientes a ARN de origen bacteriano.

Con el objetivo de confirmar la presencia del fragmento de interés en los vectores recombinantes, se realizaron digestiones simples y dobles utilizando las enzimas de restricción XbaI y EcoRI. Los cortes simples permitieron linealizar el vector dado que el mismo contiene una única secuencia para cada enzima, mientras que la digestión simultánea liberó el fragmento de interés de aproximadamente 800 pb (Figura 24).

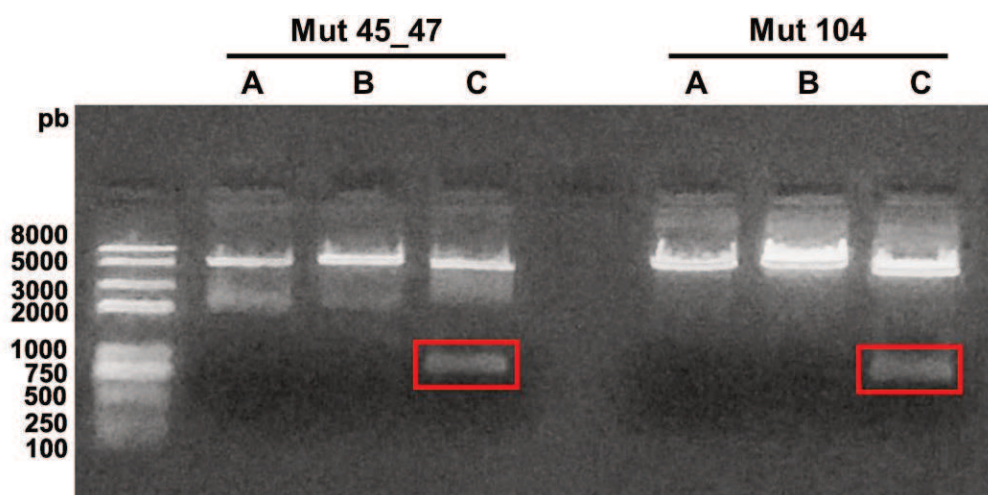


Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión enzimática. En la parte superior se indican las calles sembradas de las digestiones correspondientes a cada muteína. Calles: (A) digestión simple con XbaI; (B) digestión simple con EcoRI; (C) digestión doble con XbaI y EcoRI. A la izquierda del gel (carril 1) se observa la migración de los MMM indicándose, además, sus MM. El rectángulo rojo indica la presencia del fragmento de interés de aproximadamente 800 pb liberado por las digestiones dobles.

Finalmente, se evaluó la pureza de las preparaciones de ADN. La relación de absorbancias resultó de 1,8 para la Mut 45_47, mientras que para la Mut 104 fue de 1,9; resultando en todos los casos apropiada para su utilización en el ensamblado de las PLV.

A partir de ellas, se realizaron 3 transducciones consecutivas de células HEK-293, procediéndose posteriormente al proceso de presión selectiva con puromicina para seleccionar las células con mayores niveles de expresión de las muteínas de interés. Se utilizaron concentraciones crecientes desde 4 a 320 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

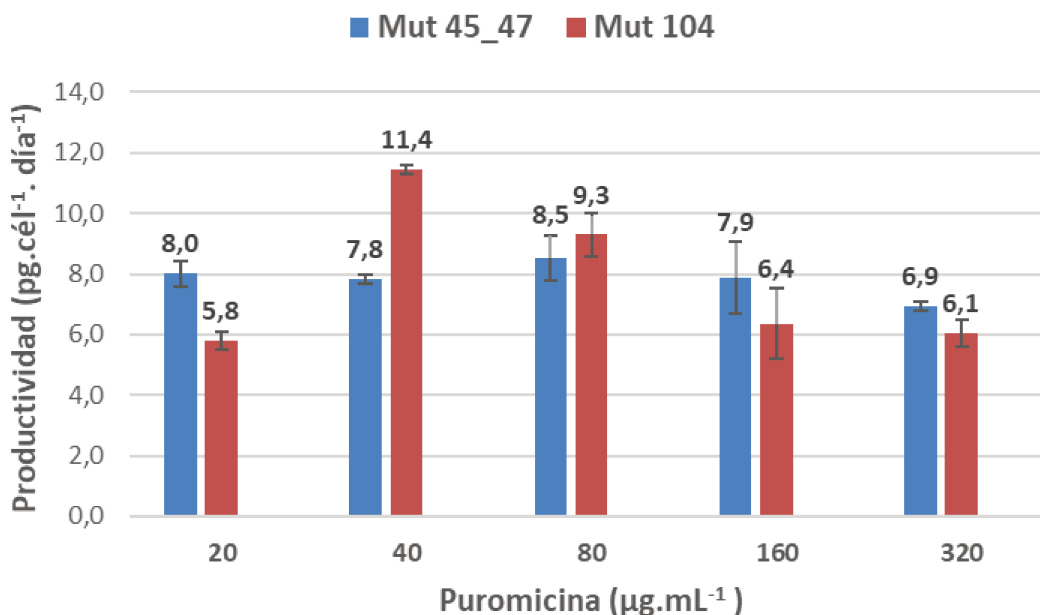


Figura 25. Evaluación de la productividad celular de las líneas HEK recombinantes.

La productividad específica de las variantes de hEPO se graficó en eje de ordenadas en función de la concentración de puromicina desde 20 a 320 µg.mL⁻¹. La productividad celular promedio de cada estadio se indica en la parte superior de cada barra.

La Figura 25 muestra las productividades obtenidas para cada concentración de puromicina empleada como condición de selección. La condición de máxima productividad celular se alcanzó con 40 µg.mL⁻¹ de puromicina para la línea productora de la variante Mut 104 (11,4 ± 0,2 pg.cél⁻¹.día⁻¹), mientras que para la línea productora de Mut 45_47 la mayor productividad se obtuvo con 80 µg.mL⁻¹ (8,5 ± 0,7 pg. cél⁻¹. día⁻¹). Estas condiciones se seleccionaron para proceder con la etapa de producción de las variantes de hEPO. Asimismo, se generaron bancos celulares para resguardar las líneas recombinantes. Los sobrenadantes provenientes del análisis de la productividad fueron evaluados por SDS-PAGE seguido de *Western blot* con el objetivo de confirmar la identidad de las nuevas proteínas recombinantes y, simultáneamente, realizar una comparación preliminar con relación al grado de glicosilación analizando la MM aparente entre las variantes de hEPO producidas por las líneas celulares CHO y HEK. Para ello, se sembraron masas equivalentes de ambas variantes.

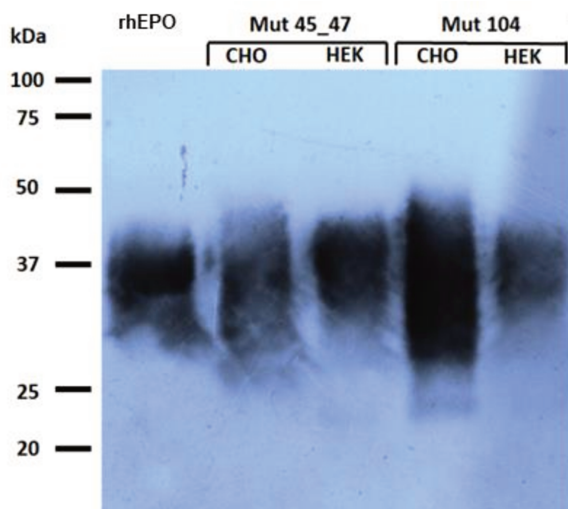


Tabla 9. Rango de MM de las variantes de hEPO

Variante	MM (kDa)
rhEPO	30-43
Mut 45_47 CHO.K1	25-50
Mut 45_47 HEK293	30-46
Mut 104 CHO.K1	23-50
Mut 104 HEK-293	35-43

Figura 26. Western blot de los sobrenadantes de cultivo de las muteínas de hEPO expresadas en células CHO y HEK. En la parte superior se indican los carriles de siembra correspondientes a los MMM, rhEPO y a las dos muteínas producidas en células CHO.K1 y HEK-293.

En la Figura 26 se observan perfiles electroforéticos de rhEPO y de las variantes Mut 45_47 y Mut 104 expresadas en células CHO y HEK. Dichos perfiles se caracterizan por una banda de gran amplitud como consecuencia de la presencia de múltiples isoformas para cada proteína. No obstante, las variantes expresadas en CHO exhibieron rangos de MM más amplios, probablemente debido a una mayor heterogeneidad de isoformas. En algunas calles como la correspondiente a Mut 104 CHO, se visualiza una banda de MM entre 20 y 25 kDa, que podría coincidir con muy baja proporción de proteína no glicosilada o conteniendo glicanos de escasa MM como los conferidos por la O-glicosilación del residuo Ser126. Asimismo, es importante destacar que no se observa la presencia de agregados de elevada MM en ninguna de las muestras analizadas.

Con relación a los perfiles de MM, las variantes producidas en células HEK exhibieron rangos de MM aparente menores al ser comparadas con sus análogas expresadas por la línea celular CHO. Esta diferencia podría deberse a que las estructuras glicosídicas generadas por células humanas tienen un menor grado de complejidad, determinado por un menor grado de antenaridad y/o menor contenido de ácido siálico.

4.2.2. Producción de las variantes hiperglicosiladas de hEPO en células HEK

Las líneas celulares HEK recombinantes fueron producidas en condiciones de adherencia. La producción se realizó mediante el recambio de medio de producción cada 48 o 72 h y se

extendió durante 7 cosechas. La concentración de las cosechas se evaluó mediante ES indirecto.

La Tabla 10 resume los datos de la producción en células HEK de cada muteína.

Tabla 10. Producción de las variantes hiperglicosiladas de hEPO expresadas en células HEK-293

Variante	Número de cosechas	Concentración promedio ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Masa acumulada (mg)
Mut 45_47	7	31	26
Mut 104	7	28	23

Normalmente las producciones en adherencia alcanzan unas 10 cosechas. Sin embargo, durante la producción de las muteínas mediante su expresión en células HEK-293 se obtuvo un total de 7 cosechas para cada variante debido al desprendimiento de la monocapa formada por las células productoras. Esto resultaba esperable considerando que la línea celular HEK presenta una adhesión más débil a la superficie de las placas de cultivo. Las concentraciones obtenidas para la Mut 45_47 y Mut 104 resultaron similares entre ellas. La masa total obtenida de cada variante se consideró apropiada para proceder a su purificación mediante CIA.

4.2.3. Purificación de las variantes hiperglicosiladas de hEPO por CIA

Se procedió a utilizar el mismo protocolo de purificación empleado para las variantes expresadas en CHO.K1 y descrito previamente. De igual modo, se utilizó la solución de elución Glicina 0,15 M pH 3.

En todos los casos se respetó la capacidad teórica para calcular la masa a sembrar. En la Figura 27 se muestra, a modo de ejemplo, un cromatograma obtenido durante uno de los ciclos de purificación de cada una de las muteínas de hEPO.

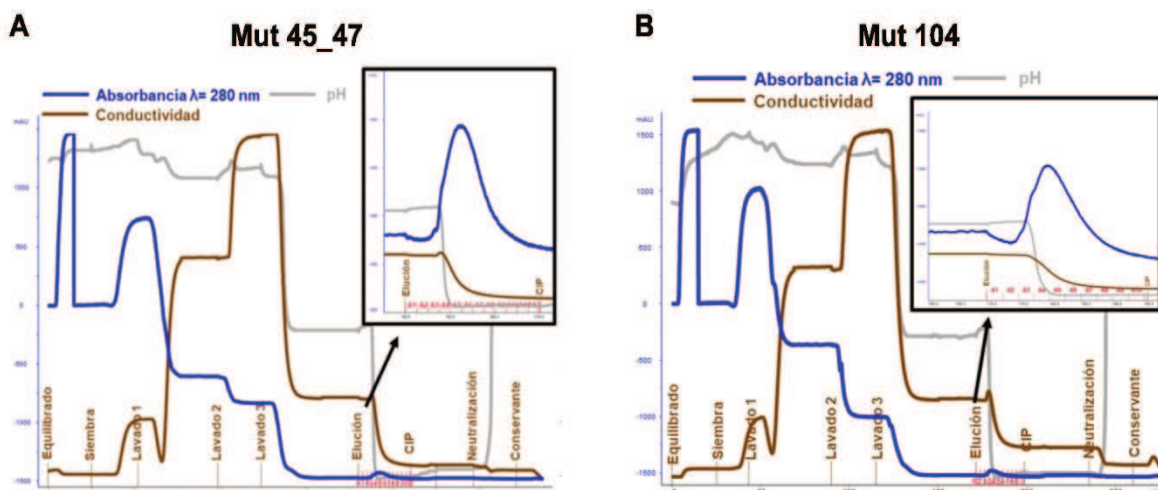


Figura 27. Purificación mediante CIA de las muteínas Mut 45_47 (A) y Mut 104 (B) producidas en células HEK. En los cromatogramas se representan las señales de absorbancia a $\lambda=280$ nm (azul), pH (gris) y conductividad (marrón) en función del volumen de elución. Mediante líneas perpendiculares al eje de abscisas se indica, además, el inicio de cada una de todas las etapas del proceso cromatográfico. En el recuadro superior derecho de cada figura se muestra una ampliación del pico de elución, indicándose las fracciones recolectadas (rojo). Para una visualización detallada de las señales de detección y de las partes de los cromatogramas, cada uno de ellos fue reiterado en forma ampliada, constituyendo la Figura A2 de la sección 6. ANEXO (página 146).

La señal correspondiente a la absorbancia a $\lambda=280$ nm evidenció que el mayor contenido de la proteína de interés se obtuvo entre las fracciones 3 y 6. Los valores de recuperación de las diferentes etapas del proceso de CIA fueron calculados a partir de la cuantificación de las variantes mediante ES indirecto.

De forma análoga a los resultados obtenidos en los procesos de CIA de muteínas de hEPO derivadas de células CHO, no se observaron pérdidas considerables de las muteínas en las etapas de FT o lavados, demostrando la capacidad del mAb para retener las muteínas expresadas también en células HEK.

Los eluatos con mayor contenido de las variantes de hEPO fueron concentrados y diafiltrados empleando PBS. En una etapa posterior se realizó la evaluación del grado de pureza mediante SDS-PAGE seguido de tinción con colorante azul brillante de *Coomassie* y densitometría de bandas coloreadas. La Tabla 11 resume la recuperación y la pureza obtenidas durante el proceso de purificación de las variantes de hEPO expresadas en células HEK.

Tabla 11. Purificación de las muteínas de hEPO expresadas en células HEK

Variante	N° ciclos de CIA	Rendimiento promedio (%)*	Pureza (%)
Mut 45_47	9	35	92
Mut 104	6	52	93

* El rendimiento promedio hace referencia a la recuperación porcentual obtenida durante la etapa de elución.

En la Figura 28 se observan nuevamente tres bandas principales como proteínas contaminantes, con MM aproximadas de 66, 50 y 25 kDa. La banda de 66 kDa probablemente corresponde a la BSA derivada del SFB empleado como suplemento del medio de cultivo, mientras que las bandas de 50 y 25 kDa coinciden con las MM de las cadenas pesada y liviana del mAb 2B2 desprendido de la matriz de IA. No obstante, esas impurezas representan un porcentaje inferior al 8%, permitiendo generar lotes de las variantes expresadas en HEK con un elevado grado de pureza para un único paso cromatográfico (superior al 92%) y útiles para su posterior caracterización fisicoquímica y biológica.

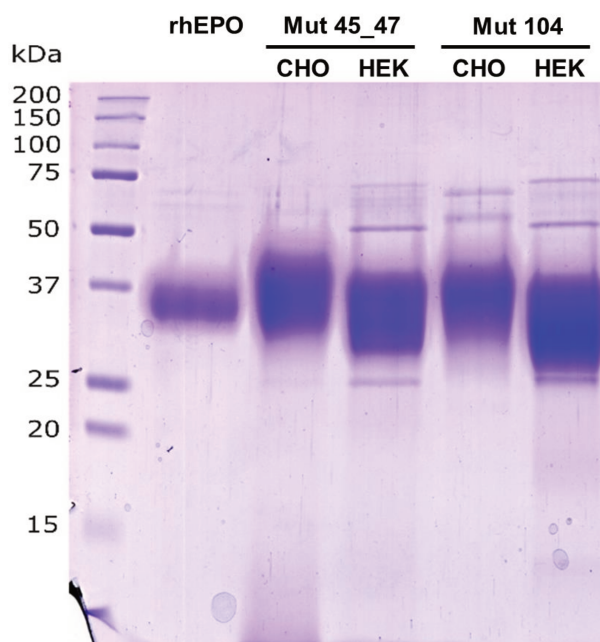


Figura 28. SDS-PAGE de las variantes expresadas en células CHO.K1 y HEK-293. En la parte superior se indican los carriles de siembra correspondientes a los MMM, rhEPO y a las muteínas Mut45_47 y Mut 104 producidas en células CHO.K1 y HEK-293 y purificadas mediante CIA.

4.2.4. Caracterización fisicoquímica

4.2.4.1. Análisis de los perfiles de MM

Los perfiles de MM de las variantes Mut 45_47 y Mut 104, expresadas en HEK y, posteriormente purificadas, fueron evaluadas mediante SDS-PAGE seguido de tinción con colorante azul brillante de *Coomassie* y comparadas con respecto a sus análogas expresadas en la línea celular CHO.K1.

Como se observó de forma preliminar en el ensayo de *Western blot* a partir de los sobrenadantes de cultivo, las muteínas producidas en uno y otro tipo celular exhibieron una marcada diferencia en los rangos de MM aparentes siendo inferiores para las variantes producidas en células HEK (Figura 28 y Tabla 12). Teniendo en cuenta que la secuencia aminoacídica es la misma para las proteínas expresadas en ambos linajes celulares, las diferencias observadas se deberían a que las estructuras glicosídicas presentes en las variantes producidas por esta línea celular tienen un menor grado de complejidad que las producidas en células CHO.K1 (microheterogeneidad) o bien que tengan un grado de ocupación diferente de los sitios de N-glicosilación (macroheterogeneidad). Este resultado es consistente con diferentes estudios reportados por otros autores para diferentes glicoproteínas expresadas en ambas líneas celulares [112,114,115,143].

Tabla 12. MM aparente de rhEPO y de sus variantes

Molécula	Rango de MM (kDa)
rhEPO	30-39
Mut 45_47 CHO.K1	33-50
Mut 45_47 HEK-293	30-45
Mut 104 CHO.K1	27-48
Mut 104 HEK-293	30-45

4.2.4.2. Análisis de los perfiles de glicoisofomas mediante IEF

El grado de heterogeneidad de las isoformas de rhEPO y sus variantes producidas por ambas líneas celulares fue evaluado por IEF utilizando un gradiente de pH entre 3,5 y 5,5. El número total de isoformas presentes en cada proteína fue determinado mediante densitometría de bandas coloreadas.

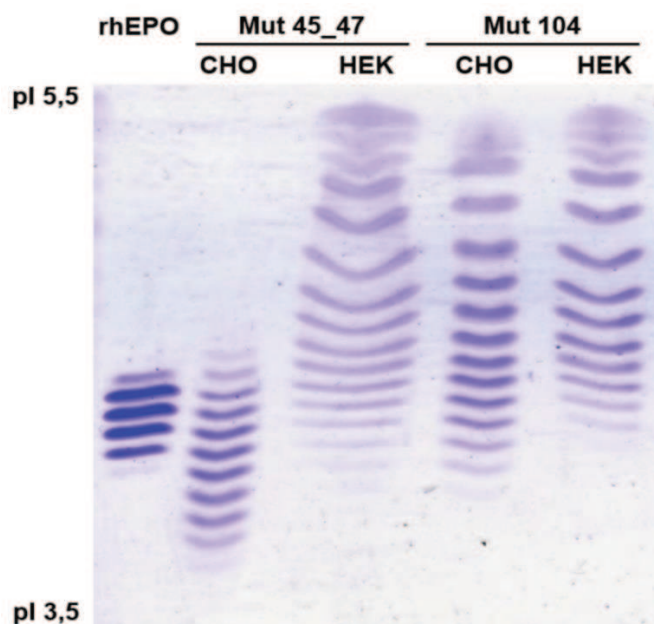


Figura 29. IEF de rhEPO y de sus variantes. En la parte superior se indican los carriles de siembra correspondientes a rhEPO y a las variantes Mut45_47 y Mut 104 producidas en células CHO.K1 y HEK-293 y purificadas mediante CIA. A la izquierda del gel se indica la zona de pH en la que los anfolitos detienen su migración durante el preenfocado.

El análisis realizado a través de la técnica de IEF permitió demostrar claras diferencias en los perfiles de glicoisofomas de las variantes producidas por cada línea celular.

Particularmente, la Mut 45_47 expresada en células CHO.K1 y HEK-293 exhibió un total de 11 y 15 isoformas, respectivamente. Esta muteína presentó un contraste muy marcado al expresarse en cada huésped celular. La variante CHO presentó incluso 4 isoformas más ácidas que rhEPO. Es importante destacar que la rhEPO utilizada en el análisis corresponde al producto comercial empleado para el tratamiento de la anemia, cuya formulación está compuesta por las isoformas más ácidas obtenidas a partir del proceso de producción a partir de células CHO.K1. La muteína expresada en HEK mostró un patrón de isoformas menos ácido, siendo las isoformas más ácidas de esta proteína, aquellas comunes con rhEPO. Por otra parte, los perfiles observados para la Mut 104 tuvieron mayor grado de similitud; la variante producida en HEK exhibió 14 glicofomas, de las cuales 11 fueron compartidas por su contraparte producida en células CHO.K1. En particular, la Mut 104 expresada en CHO mostró un amplio rango de isoformas con isoformas menos y más ácidas que las de rhEPO.

A pesar de las diferencias en el número de isoformas a lo largo de las distintas variantes, se pudo observar un patrón distintivo: las variantes expresadas en CHO exhibieron

isoformas más ácidas (incluso de mayor acidez que las de rhEPO) mientras que las expresadas en HEK mostraron una elevada proporción de isoformas menos ácidas.

4.2.4.3. Análisis de macroheterogeneidad

Con el objetivo de evaluar el grado de ocupación de los sitios de N-glicosilación en las variantes producidas en células HEK, las mismas fueron tratadas con la enzima PNGasa F durante distintos tiempos y evaluadas mediante SDS-PAGE (Figura 30).

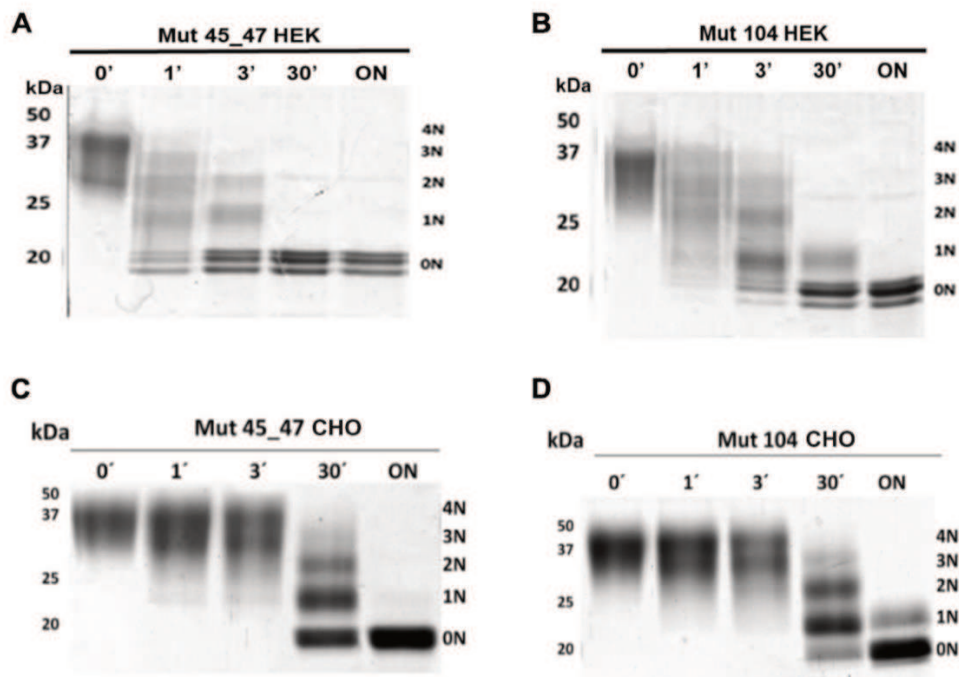


Figura 30. Análisis de macroheterogeneidad. (A) Variante Mut 45_47 y (B) variante Mut 104 producidas en células HEK, incubadas con PNGasa F durante 0, 1, 3, 30 min y ON (toda la noche, del inglés *overnight*) a 37 °C. (C) Variante Mut 45_47 y (D) variante Mut 104 producidas en células CHO y sometidas al mismo tratamiento, extraídas de Bürgi et al. (2021) [111]. A la derecha de los geles se indica el grado de ocupación con glicanos desde ningún sitio ocupado (0N) hasta los 4 sitios ocupados (4N).

El proceso de N-deglicosilación parcial permitió confirmar la ocupación completa de los sitios de N-glicosilación a través de la visualización de 5 regiones de isoformas (con rangos de MM correspondientes a 4, 3, 2, 1 sitio de N-glicosilación y completamente N-deglicosilada) que surgen a medida que avanza el tiempo de incubación, de la misma manera que fuera observado para las variantes expresadas en CHO [111]. De este modo, se puso en evidencia que las diferencias visualizadas entre las variantes producidas en células CHO y HEK se encuentran determinadas por su microheterogeneidad, como

consecuencia de la presencia de estructuras glicosídicas más simples en las variantes producidas en las células humanas. Notablemente, el tiempo necesario para la hidrólisis de los N-glicanos de las variantes expresadas en células HEK fue significativamente menor que para las muteínas producidas en células CHO. Así, la N-deglicosilación total requirió aproximadamente 30 min para las variantes de HEK, mientras que demandó el tratamiento durante toda la noche para las de CHO como se observó en Bürgi y col. (2021) [111]. Adicionalmente, en la región del gel correspondiente a la muestra completamente N-deglicosilada (inferior a 20 kDa e indicada como 0N) se observaron tres bandas proteicas para las variantes expresadas en HEK, que no fueron observadas en las muteínas expresadas en CHO. Las mismas podrían corresponder a: (i) una forma completamente N-deglicosilada pero O-glicosilada con uno o dos residuos de ácido siálico, (ii) una forma completamente N-deglicosilada pero O-glicosilada con un residuo de ácido siálico o sin ellos, y (iii) una forma completamente N- y O-deglicosilada. Para confirmar esta hipótesis se realizó una digestión simultánea con PNGasa F y con α 2-3,6,8,9 Neuraminidasa A, lo que permitió evidenciar la presencia de dos bandas, aspecto que confirma la hidrólisis de los residuos de ácido siálico por parte de la neuraminidasa (Figura 31) para alcanzar una banda N-deglicosilada pero O-glicosilada sin ácidos siálicos y otra banda sin N- ni O-glicanos.

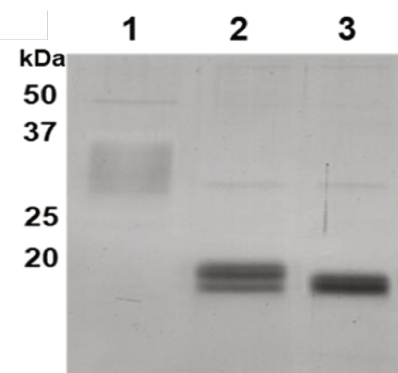


Figura 31. Análisis de microheterogeneidad de Mut 45_47 HEK. Se analizó la heterogeneidad de las bandas de MM inferior a 20 kDa correspondiente al sitio de O-glicosilación de la Mut 45_47 (C). Calle 1, Mut 45_47 HEK nativa; calle 2, Mut 45_47 HEK tratada durante 24 h con PNGasa F; calle 3, Mut 45_47 HEK tratada durante 24 h con PNGasa F y Neuraminidasa A.

4.2.4.4. Cuantificación de ácido siálico

La presencia de AS terminal en las cadenas de los oligosacáridos presentes en las glicoproteínas es un aspecto sumamente importante, ya que contribuye a aumentar el tiempo en circulación sanguínea, mejorando los perfiles farmacocinéticos. La cuantificación

del contenido del ácido siálico correspondiente al ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) de rhEPO y de sus variantes se realizó mediante cromatografía de HPAEC-PAD.

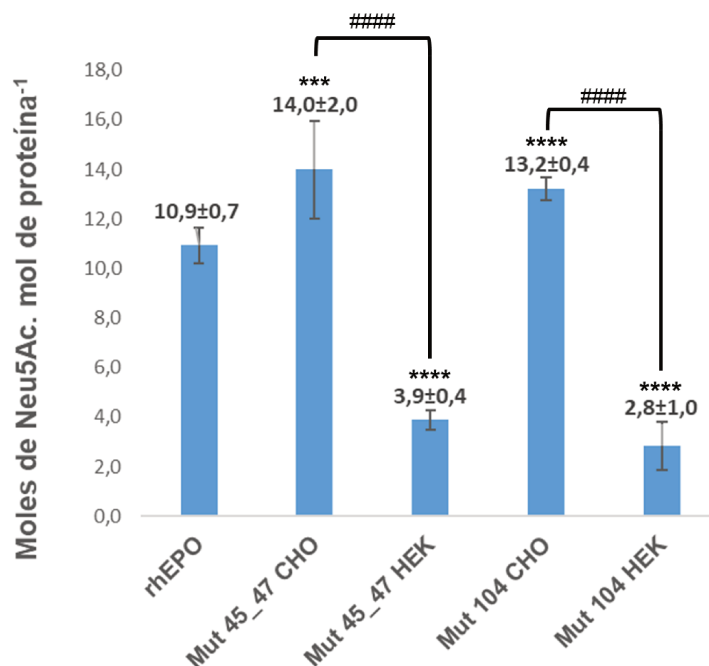


Figura 32. Cuantificación de Neu5Ac mediante HPAEC-PAD. En el eje de ordenadas se graficó la proporción de moles de Neu5Ac por mol de proteína en función de las variantes de hEPO analizadas. Los datos se expresan como media \pm SD. Análisis estadístico mediante la prueba t de Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ de variantes frente a rhEPO; #### $p < 0,0001$ de variantes producidas en distintas líneas celulares.

Los resultados fueron consistentes con las observaciones realizadas a partir del ensayo de IEF, el cual mostró un mayor predominio de isoformas más ácidas en las variantes producidas en células CHO. En este sentido, las muteínas producidas por esta línea celular exhibieron un contenido significativamente más alto de Neu5Ac en comparación con sus respectivos análogos expresados en células HEK. Específicamente, esta diferencia fue de 3,6 veces para la proteína Mut 45_47 y de 4,7 veces para la proteína Mut 104.

Además, el perfil de mayor contenido de glicoisofomas más ácidas de la variante Mut 45_47 observado en el procedimiento de IEF se correlacionó con su mayor contenido de AS evaluado por esta técnica cromatográfica.

Es importante mencionar que el valor registrado para rhEPO ($10,9 \pm 0,7$) es comparable con aquellos reportados en la bibliografía [51–53,144], siendo menor que los determinados para las muteínas producidas en CHO, lo que constituye un resultado esperable como

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

consecuencia de la introducción de un sitio adicional de N-glicosilación en estas variantes respecto de la molécula original.

Por otro lado, tanto rhEPO como sus variantes expresadas en células CHO mostraron pequeñas cantidades de la variante N-glicolilneuramínico (Neu5Gc), valores que no pudieron ser cuantificados debido a que en nuestro laboratorio no disponíamos del estándar para este residuo (Figura 33). La presencia de esta variante de AS en rhEPO ha sido reportada por distintos autores [52,53,145,146] y representa un aspecto que adquiere fundamental importancia cuando las células utilizadas para la producción de biofármacos no son humanas, debido a que la cantidad de Neu5Gc debe ser monitoreada como consecuencia de su potencial inmunogénico y antigénico. Dicha inmunogenicidad y antigenicidad puede manifestarse por la generación de anticuerpos y por el reconocimiento de la molécula por poblaciones de anticuerpos neutralizantes naturalmente presentes, estas situaciones conducen a limitar la eficacia del medicamento [27,147].

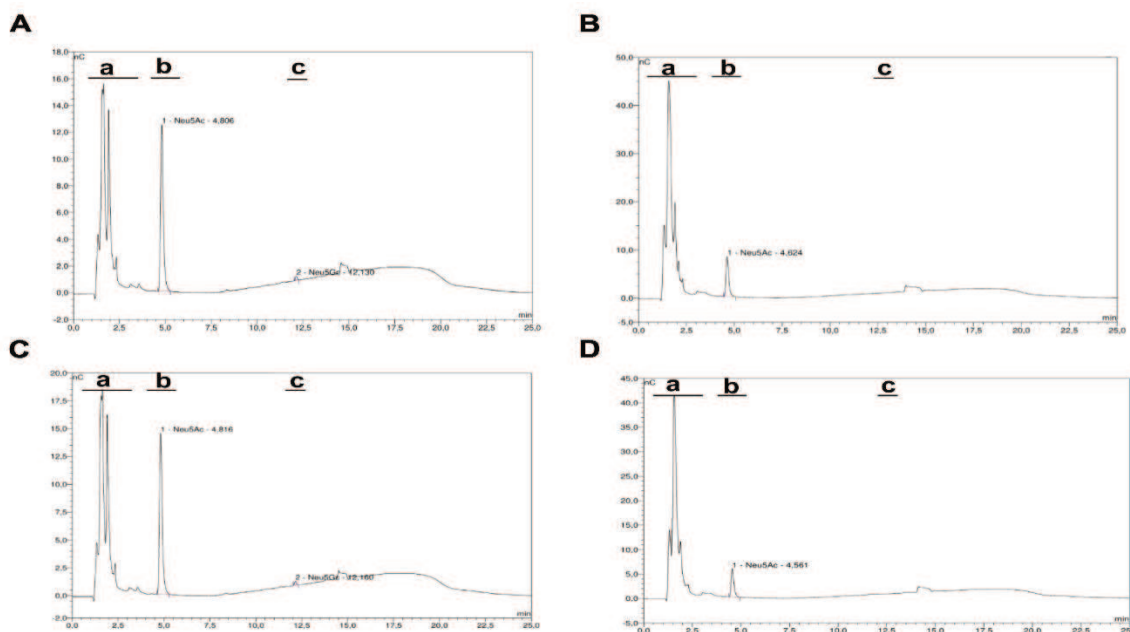


Figura 33. Cuantificación de las variedades de AS: Neu5Ac y Neu5Gc mediante HPAEC-PAD. Cromatogramas correspondientes a su determinación en las variantes Mut 45_47 CHO (A), Mut 45_47 HEK (B), Mut 104 CHO (C) y Mut 104 HEK (D).

En los cromatogramas se representa la señal eléctrica detectada (nC) en función del tiempo de retención (min). En cada uno de ellos se distinguen regiones correspondientes a los remanentes glicoproteicos derivados del proceso de hidrólisis (a), detección de Neu5Ac (b) y detección de Neu5Gc (c).

En contraste, este mismo AS no pudo ser detectado para las variantes expresadas en HEK, confirmando la incapacidad de estas células para sintetizar Neu5Gc como consecuencia de una mutación en el gen que codifica la enzima hidroxilasa CMAH (citidina monofosfato-N-acetilneuramínico hidroximetilasa) que cataliza la conversión del Neu5Ac a

Neu5Gc [148,149]. En este sentido, las muteínas producidas en células HEK podrían exhibir un menor grado de inmunogenicidad, lo que constituiría una ventaja terapéutica con relación a sus análogos producidos en células CHO.

4.2.4.5. Análisis de la estabilidad térmica

Con el objetivo de evaluar si el cambio en la composición y complejidad de los glicanos presentes en las variantes producidas en células HEK genera un impacto en la estructura terciaria de la proteína, la estabilidad térmica de estas variantes fue evaluada mediante la técnica de TS utilizando el mismo protocolo aplicado a sus análogos producidos en células CHO (Figura 34).

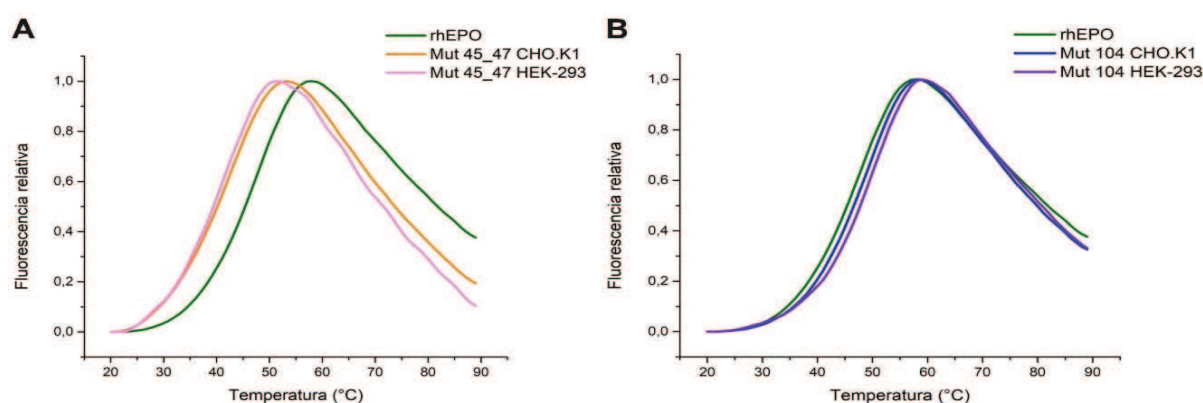


Figura 34. TS de rhEPO y de sus variantes producidas en células HEK-293. Se realizó la comparación de las variantes Mut 45_47 (A) y Mut 104 (B) producidas por ambas líneas celulares. En el eje de ordenadas se representa la fluorescencia relativa en función de la temperatura.

La T_M de las variantes producidas en células HEK fue calculada por ajuste no lineal de los datos experimentales registrados y se resumen en la Tabla 13, en donde se comparan con sus análogos producidos en células CHO.

Tabla 13. Temperatura de fusión de rhEPO y de sus variantes

Variante	T_M (°C)	
rhEPO	50,5±0,4	
Mut 45_47	CHO.K1	45,3±0,4
	HEK-293	44,3±0,5
Mut 104	CHO.K1	52,5±1,3
	HEK-293	52,5±0,2

La presencia del glicano en sí mismo o la mutación efectuada produjo un descenso de 5 °C en la T_M de la variante Mut 45_47 mientras que produjo un incremento de 2 °C en la correspondiente a la variante Mut 104. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en las T_M de cada variante expresada en uno u otro hospedador celular, demostrando que las diferencias en los patrones de glicosilación entre ambas líneas celulares no generaron un impacto sobre el plegamiento de las proteínas.

4.2.5. Evaluación *in vitro* de la actividad biológica

4.2.5.1. Evaluación de la actividad eritropoyética

La AE *in vitro* de las variantes derivadas de células humanas fue evaluada empleando la línea celular UT-7. Se incluyeron además los análogos correspondientes con el objetivo de realizar la comparación entre ambos linajes celulares.

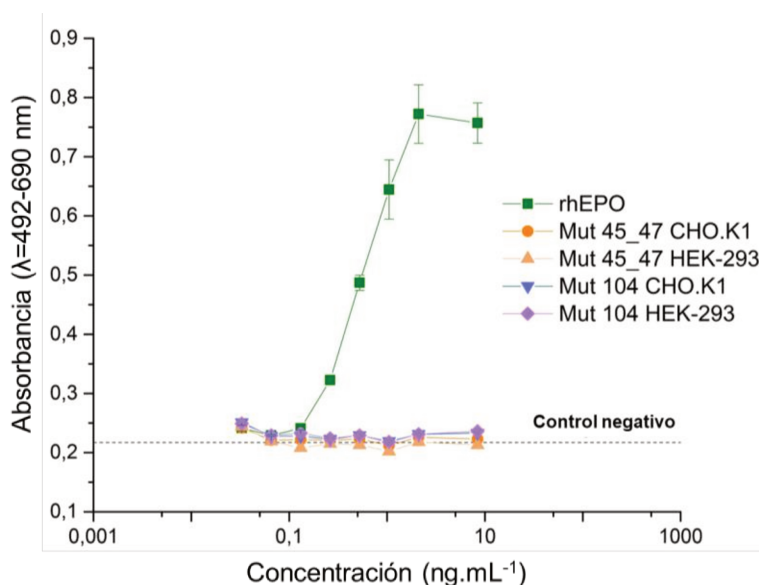


Figura 35. AE *in vitro* utilizando células UT-7. En el eje de ordenadas se graficó la señal de absorbancia de las muestras luego de completar la reacción colorimétrica en función de la concentración del estándar (rhEPO) o de las variantes expresadas en ambos hospedadores celulares.

Como se observa en la Figura 35, ninguna de las variantes de hEPO, expresadas en CHO o HEK, fue capaz de estimular la proliferación celular, demostrando la ausencia de AE *in vitro*. Esta falta de respuesta es atribuida a la modificación realizada sobre las variantes de hEPO, ya sea por la modificación aminoacídica o por un impedimento estérico provocado por la glicosilación para unir al receptor homodimérico, por medio del cuál desencadena su función eritropoyética. Contrariamente, rhEPO demostró su función eritropoyética

evidenciada por una curva de proliferación dosis-dependiente utilizando la línea celular UT-7.

4.2.5.2. Evaluación de la actividad neuroplástica

Como se mencionó previamente, los efectos neuroactivos de hEPO para promover la supervivencia neuronal, la diferenciación y la neuritogénesis han sido ampliamente descritos. En consecuencia, estudios *in vitro* de neuritogénesis, formación de filopodios y sinaptogénesis son claves para el entendimiento del desarrollo neuronal, dado que reflejan procesos que suceden en el desarrollo normal del cerebro. Por lo tanto, se evaluó la capacidad de los derivados de HEK para estimular tales procesos y se realizó su comparación con las respuestas obtenidas para las variantes de CHO.

4.2.5.2.1. Evaluación de la neuritogénesis

Las neuritas son prolongaciones celulares que emergen del soma de una neurona en sus primeras etapas de desarrollo y que en etapas posteriores pueden diferenciarse en axones o dendritas [150].

Para la evaluación de la neuritogénesis se trataron células N2a indiferenciadas con distintas concentraciones de rhEPO o de las variantes en privación de SFB. Luego del tratamiento, se evaluó el promedio de la extensión de las neuritas en cada neurona para cada condición. Todas las variantes de hEPO exhibieron un incremento dosis-dependiente en su capacidad para promover la neuritogénesis observado en la medición de la extensión de neuritas. A partir del análisis estadístico se determinó que todas las variantes evaluadas fueron capaces de estimular la generación de neuritas de manera significativa al ser administradas en una dosis de 300 ng.mL^{-1} . Con respecto a la menor concentración evaluada (50 ng.mL^{-1}), se vislumbró un incremento, pero el mismo no resultó estadísticamente significativo (Figura 36). Asimismo, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con la misma variante expresada en diferentes hospedadores celulares y evaluadas en las mismas concentraciones.

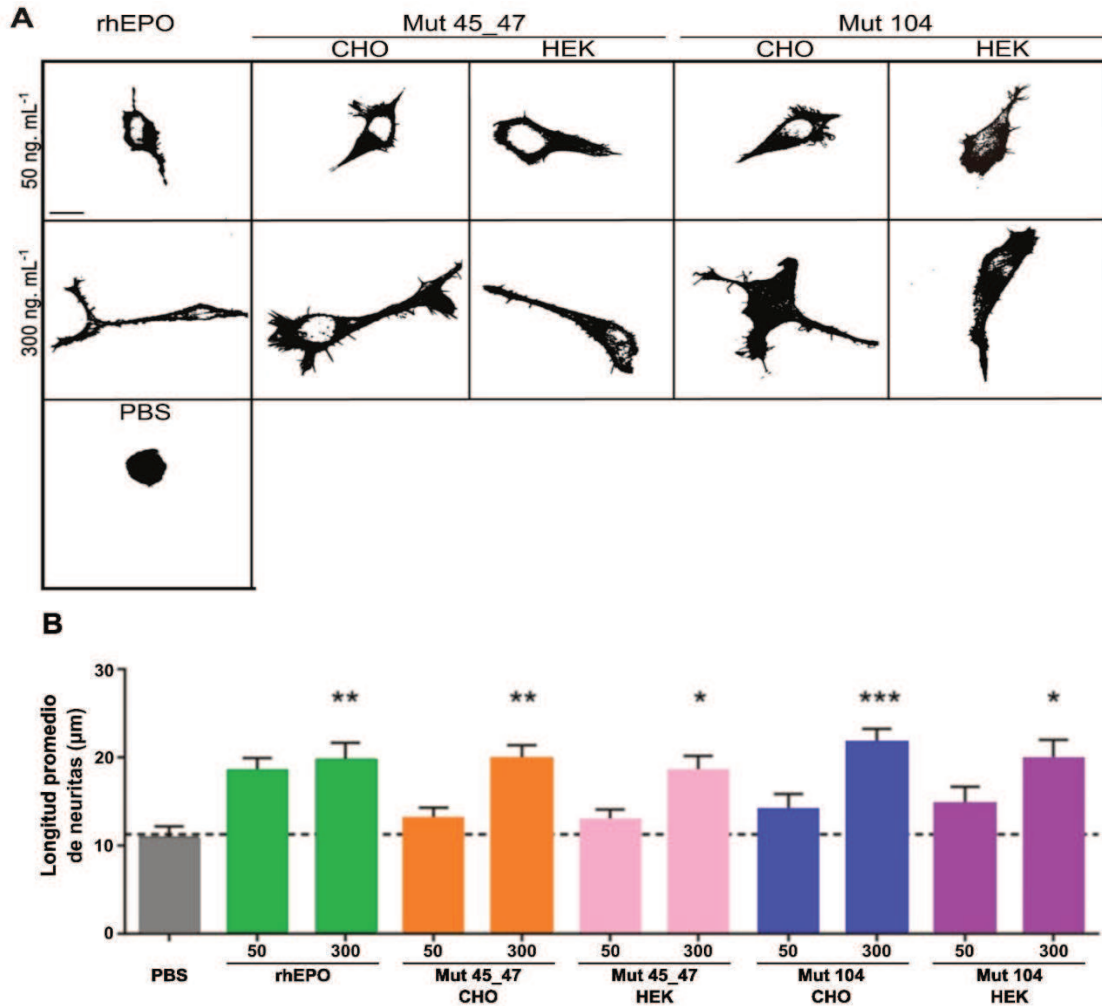


Figura 36. Evaluación de la neuritogénesis *in vitro* en cultivos de células N2a. (A) Imágenes representativas de células N2a privadas de suero y tratadas con cada condición (Barra de escala: 20 µm). (B) Cuantificación de longitud promedio de neuritas. Las células fueron tratadas con 50 y 300 ng.mL⁻¹ de rhEPO o de sus variantes. En el eje de ordenadas se graficó la longitud promedio de neuritas en función de cada variante en eje de abscisas. Los resultados se expresaron como media ± SEM de n=20-25 células por condición correspondientes a 2 ensayos independientes. Prueba estadística de ANOVA de una vía con corrección de Bonferroni de rhEPO (control positivo) o de muteínas frente al control negativo (PBS) * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Los resultados obtenidos fueron comparables a los reportados para rhEPO sobre cultivos primarios de neuronas, en los que también se observó una correlación positiva entre la elongación de las neuritas y la concentración evaluada de la citoquina [151,152]. Más específicamente, los valores registrados para la molécula original y las variantes producidas en células CHO resultaron equivalentes a los descritos por Bürgi y col. [111].

4.2.5.2.2. Evaluación de la formación de filopodios

Los filopodios conforman un grupo de pequeñas prolongaciones celulares membranosas formadas dentro de las neuritas que participan en los procesos de detección de señales químicas, migración de neuronas y formación de nuevas conexiones entre las mismas [153].

Para determinar la densidad de filopodios, se emplearon cultivos primarios de neuronas de hipocampo de ratas, las cuáles fueron tratadas durante 4 DIV con distintas concentraciones de rhEPO o de sus variantes.

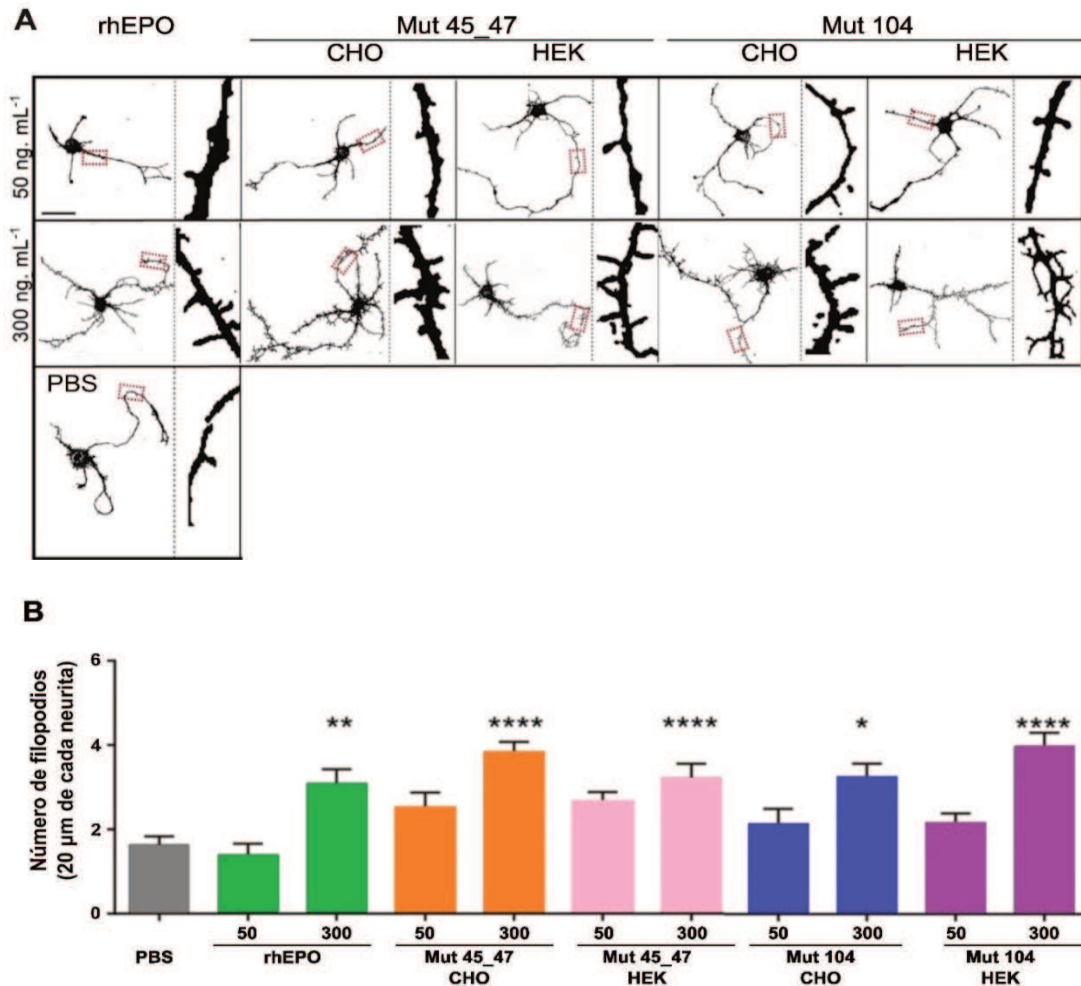


Figura 37. Evaluación de la densidad de filopodios. (A) Imágenes representativas y sus ampliaciones de neuronas de hipocampo de rata luego de 4 DIV, tratadas con cada condición. Barra de escala: 20 μm. (B) Cuantificación del número de filopodios. Las células fueron tratadas con 50 y 300 ng mL⁻¹ de rhEPO o de sus variantes. En el eje de ordenadas se graficó en número de filopodios en función de cada variante en eje de abscisas. Los resultados se expresaron como la media ± SEM de n=15-20 células por condición correspondientes a 2 ensayos independientes. Prueba estadística de ANOVA de una vía con corrección de Bonferroni de rhEPO (control positivo) o de las muteínas frente al control negativo (PBS) * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; ****p<0,0001.

Tanto rhEPO como las muteínas producidas por ambas líneas celulares exhibieron un efecto estimulador de la formación de filopodios en los cultivos primarios de neuronas de hipocampo. Dicho efecto fue estadísticamente significativo para la condición de 300 ng.mL⁻¹ (Figura 37). Del mismo modo que lo observado en la evaluación de neuritogénesis, se evidenció un incremento dosis-dependiente de la respuesta a pesar de que la menor concentración ensayada no mostró diferencias estadísticamente significativas frente al control (PBS) utilizado en el ensayo. Asimismo, las neuronas tratadas con 50 ng.mL⁻¹ de las muteínas evidenciaron un notable aumento con respecto a rhEPO, lo que podría sugerir que las muteínas poseen una mayor eficiencia para desencadenar la respuesta neuroplástica referente a la generación de filopodios. Nuevamente, no se observaron diferencias significativas entre las respuestas al tratamiento con una misma variante expresada en ambas líneas celulares y en las mismas concentraciones.

4.2.5.2.3. Evaluación de la formación de sinapsis

La sinapsis constituye la conexión funcional entre neuronas, proceso que permite la transmisión de señales en el sistema nervioso. El efecto estimulador de rhEPO y de sus variantes en la sinaptogénesis fue evaluado cuantificando la colocalización de los marcadores presináptico (Syn) y postsináptico (NMDA-R1) en cultivos primarios de neuronas de hipocampo de ratas de 15 DIV tratados con distintas concentraciones de rhEPO o de sus variantes.

Como muestra la Figura 38, se observó una respuesta dosis-dependiente de la sinaptogénesis para todas las proteínas, no evidenciándose nuevamente diferencias entre la misma proteína expresada en diferentes hospedadores celulares. De manera análoga al efecto observado en la evaluación de filopodios, la respuesta en la sinaptogénesis de las neuronas tratadas con una dosis de 300 ng.mL⁻¹ fue superior y estadísticamente significativa para las muteínas expresadas en ambas líneas celulares respecto de rhEPO, lo que permitiría pensar que estas variantes poseen una mayor AN *in vitro* que la molécula de rhEPO sin modificar. No obstante, dada la variabilidad de los ensayos, es necesario ser cautos con estas aseveraciones y evaluar el comportamiento de la AN *in vivo*, de manera de confirmar el efecto vislumbrado *in vitro*. De confirmarse el mencionado efecto, el mismo constituiría un potencial muy importante para las muteínas como candidatos neuroterapéuticos, dado que el incremento en la neuroplasticidad se correlaciona con mejoras en las funciones cognitivas superiores, incluyendo el aprendizaje y la memoria [154,155].

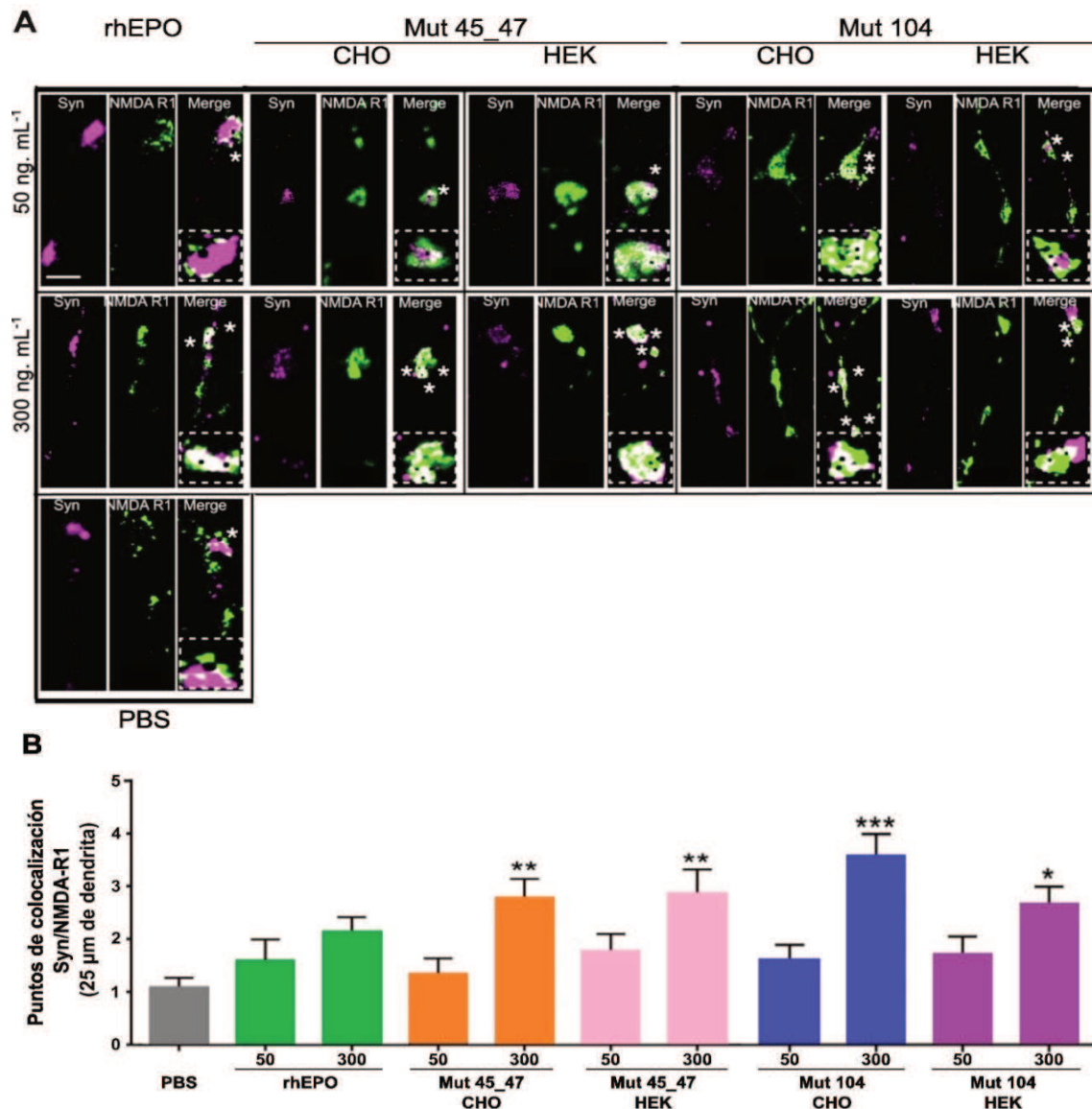


Figura 38. Evaluación de la sinaptogénesis. (A) Imágenes representativas y sus ampliaciones de neuronas de hipocampo cultivadas durante 15 DIV en presencia de los diferentes tratamientos. Las imágenes muestran 25 μm de longitud dendrítica de una neurona representativa, inmunomarcada con el marcador presináptico Syn (magenta) y el marcador postsináptico NMDA-R1 (verde). En las imágenes combinadas, los asteriscos blancos y los recuadros señalan colocación detectable de Syn/NMDA-R1 (blanco). Barra de escala: 5 μm . (B) Cuantificación de la sinaptogénesis como puntos de colocación entre los marcadores Syn y NMDA-R1 graficados en el eje de ordenadas en función de los diferentes tratamientos. Los resultados se expresaron como media \pm SEM del número de puntos de colocación de los marcadores en al menos $n=15$ neuronas por condición correspondientes a 2 ensayos independientes. Prueba estadística de ANOVA de una vía con corrección de Bonferroni de rhEPO (control positivo) o de muteínas frente al control negativo (PBS) * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

4.2.6. Evaluación de las propiedades biológicas *in vivo*

4.2.6.1. Propiedades farmacocinéticas

La influencia en la PK debido a los distintos perfiles de glicosilación mostrados por rhEPO y sus variantes expresadas en distintos hospedadores fue evaluada en ratas Wistar inyectadas por vía ip. La Figura 39 muestra los perfiles farmacocinéticos obtenidos para cada proteína estudiada.

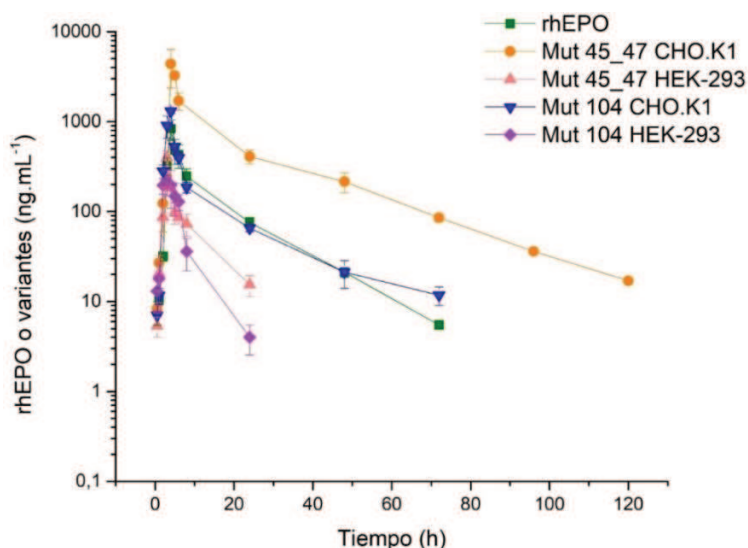


Figura 39. Perfiles PK de rhEPO y de sus variantes. Se graficó la concentración de cada proteína (rhEPO o variantes de hEPO) en función del tiempo transcurrido desde la inyección ip de las mismas. Los datos graficados corresponden al valor promedio de concentración \pm SEM ($n=4$) de las determinaciones.

Las muteínas expresadas por la línea celular CHO.K1 permanecieron mayor tiempo en circulación sanguínea, siendo detectadas en tiempos más tardíos posinyección (hasta 120 h para la variante 45_47 y 72 h para la variante 104) comparadas con sus correspondientes análogas expresadas por la línea celular HEK-293, detectables hasta sólo 24 h posadministración. Este aumento en el tiempo de circulación se encuentra influenciado por los glicanos unidos a las proteínas, los que otorgan mayor radio hidrodinámico y mayor carga negativa a pH fisiológico, prolongando su permanencia en el sistema circulatorio. Notablemente, la Mut 104 producida en células CHO exhibió un perfil farmacocinético similar al de rhEPO a pesar de contar con una cadena de N-glicanos adicional y un mayor número de residuos de ácido siálico. Esto podría deberse a la composición de isoformas de dicha muteína. Como se observó en el análisis del perfil de glicoisofomas mediante IEF, esta variante posee simultáneamente isoformas más y menos ácidas que la rhEPO sin modificar. Las primeras contribuyen a prolongar su permanencia en circulación, mientras que las restantes con menor radio hidrodinámico e inferior carga negativa son filtradas con mayor facilidad por el glomérulo renal y además interaccionan más fácilmente con los

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

receptores hepáticos de asialoglicoproteínas, los que las retiran velozmente del plasma. Estos últimos acontecimientos compensan la mayor permanencia de las isoformas más ácidas, determinando que la Mut 104 tenga un comportamiento similar al de la molécula original.

Para analizar los datos obtenidos, los modelos compartimentales de farmacocinética representan herramientas analíticas sumamente útiles que permiten predecir mediante expresiones matemáticas cómo un fármaco es absorbido, distribuido, metabolizado y eliminado del organismo. En el presente trabajo de tesis, los datos experimentales de concentración a distintos tiempos posinyección fueron ajustados a un modelo de inyección extravascular, con absorción lineal y eliminación de primer orden. A partir del ajuste se estimaron los parámetros farmacocinéticos resumidos en la Tabla 14.

Tabla 14. Parámetros PK de rhEPO y de sus variantes

	rhEPO	Mut 45_47		Mut 104	
		CHO	HEK	CHO	HEK
k_a (h ⁻¹)	0,27 ± 0,05	0,3 ± 0,2	0,55 ± 0,02	0,50 ± 0,01	0,34 ± 0,01
V_D (mL)	180 ± 10	44 ± 10	496 ± 126	121 ± 5	348 ± 103
k_e (h ⁻¹)	0,0767 ± 0,0001	0,0526 ± 0,0002	0,1368 ± 0,0009	0,12 ± 0,01	0,261 ± 0,006
AUC (ng.h. mL ⁻¹)	7240 ± 411	43734 ± 9469	1535 ± 467	7203 ± 1055	1185 ± 331
Cl (mL. h ⁻¹)	13,8 ± 0,7	2,4 ± 0,5	70 ± 18	14 ± 2	91 ± 29
C_{máx} (ng. mL ⁻¹)	339 ± 43	1615 ± 533	135 ± 42	538 ± 39	127 ± 35
T_{max} (h)	6,6 ± 0,7	7 ± 2	3,32 ± 0,05	3,79 ± 0,09	3,37 ± 0,03
t_{1/2} (h)	9,043 ± 0,007	13,17 ± 0,04	5,07 ± 0,03	6,0 ± 0,6	2,66 ± 0,06

Los parámetros PK fueron calculados para cada animal y se expresan como el valor promedio ± SD (n=4).

Las pruebas estadísticas permitieron evidenciar diferencias significativas en todos los parámetros analizados, tanto entre rhEPO y sus variantes como para una misma muteína producida por distintos linajes celulares.

Como puede observarse en la Tabla 14, la Mut 45_47 expresada en células HEK y la Mut 104 producida por ambas líneas celulares integran un grupo caracterizado por un proceso de metabolización más rápido, que se encuentra determinado por constantes de absorción (k_a) y eliminación (k_e) superiores. Esta aceleración en el metabolismo provoca que tanto el tiempo en el que se alcanza la concentración plasmática máxima ($T_{máx}$) como el tiempo de vida media de eliminación ($t_{1/2}$) se acorten con respecto a rhEPO. Una posible explicación del comportamiento observado radica en la composición de isoformas de cada variante. En este sentido, independientemente de que la Mut 104 CHO posea un mayor contenido de residuos de ácido siálico que rhEPO, las proteínas que integran este grupo poseen en común la existencia de isoformas notablemente menos ácidas y de menor radio hidrodinámico que rhEPO, que podrían estar difundiendo más rápidamente desde la cavidad peritoneal hacia el sistema circulatorio [156].

Por su parte, esta composición de isoformas de Mut 104 CHO proporciona valores de área bajo la curva (AUC) y, por ende, del *clearance* plasmático (Cl), similares a rhEPO, sin evidenciar diferencias significativas entre ambas muestras.

Asimismo, en la comparación de los parámetros PK y en concordancia con la caracterización fisicoquímica, las variantes exhibieron radicales diferencias en sus parámetros farmacocinéticos más importantes. La Mut 45_47, expresada en células CHO exhibió un $t_{1/2}$ media 2,6 veces superior y un Cl plasmático 29 veces menor respecto de su contraparte expresada en células HEK.

En el caso de la Mut 104, la mayor diferencia en la comparación entre ambas líneas celulares radicó en un $t_{1/2}$ 2,3 veces mayor y Cl plasmático 6,5 veces superior de la variante producida en células CHO respecto de su contraparte expresada en HEK. Conforme a lo esperado, la menor complejidad de las estructuras glicosídicas presentes en las variantes producidas en células HEK serían responsables de una menor vida media, y concordantemente, una mayor velocidad de eliminación plasmática. Por un lado, la presencia de glicanos con mayor grado de antenaridad, como ocurre en las proteínas producidas en CHO, provoca un aumento de la masa molecular aparente y del radio hidrodinámico, disminuyendo la velocidad de filtración glomerular. Además, el fenómeno de repulsión que se produce entre las cargas negativas de las variantes, atribuidas a los residuos de ácido siálico y los glicosaminoglicanos presentes en la superficie del glomérulo,

reducen aún más la velocidad de filtración renal [157]. Por otro lado, la presencia de residuos de AS disminuye la endocitosis y posterior proteólisis mediada por receptores hepáticos, los cuales poseen especificidad hacia residuos de galactosa o N-acetilglucosamina [158] que se encuentran enmascarados en las variantes producidas. Como consecuencia de las características otorgadas por los glicanos que decoran las proteínas producidas en células HEK, su depuración se encuentra aumentada tanto por el mecanismo renal como por el hepático.

Finalmente, es importante destacar que las variantes derivadas de células humanas exhibieron un volumen de distribución aparente significativamente superior con respecto a sus análogos, siendo este aumento de 11 veces para Mut 45_47 y de aproximadamente 3 veces para Mut 104. Si bien este parámetro no representa un volumen fisiológico del organismo donde fue realizado el estudio, se encuentra relacionado con la salida de las proteínas del sistema circulatorio y su acumulación en órganos y tejidos periféricos, siendo el SNC de principal interés [139].

Diversos autores han demostrado que algunos derivados de hEPO pueden atravesar la BHE y requieren una breve interacción para desencadenar respuestas citoprotectoras. Erbayraktar y col. [109] describieron que la asialoEPO, un análogo de hEPO generado por desialidación enzimática, que presenta una vida media plasmática inferior a una hora, fue capaz de alcanzar el SNC y exhibir un amplio espectro de actividades neuroprotectoras.

De este modo, las muteínas expresadas en células HEK podrían tener un aumento significativo en el pasaje a través de la BHE, alcanzando así el SNC para desencadenar la respuesta neuroplástica de manera similar a moléculas como la asialoEPO. Es decir, las células HEK confieren un tipo de glicanos a las moléculas de EPO que permitirían que no se eliminen tan rápidamente de circulación como la asialoEPO, pero a su vez otorgan un mayor volumen de distribución con respecto a las producidas en células CHO lo que les conferiría una mayor llegada al SNC.

4.2.6.2. Evaluación de la AN *in vivo*

El efecto de rhEPO y de sus variantes fue evaluada *in vivo* mediante el estudio la arborización (medida como el número de intersecciones desde el soma y extensión de las dendritas) que son capaces de estimular a nivel de neuronas piramidales presentes en la región CA1 del hipocampo de ratones sanos de la cepa CF-1. Este estudio representa una aproximación a modificaciones responsables de mejoras cognitivas. Para ello, las neuronas

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

fueron teñidas mediante la técnica de Golgi-Cox y el efecto neuroplástico de las glicoproteínas en estudio se cuantificó mediante el análisis de Sholl.

A

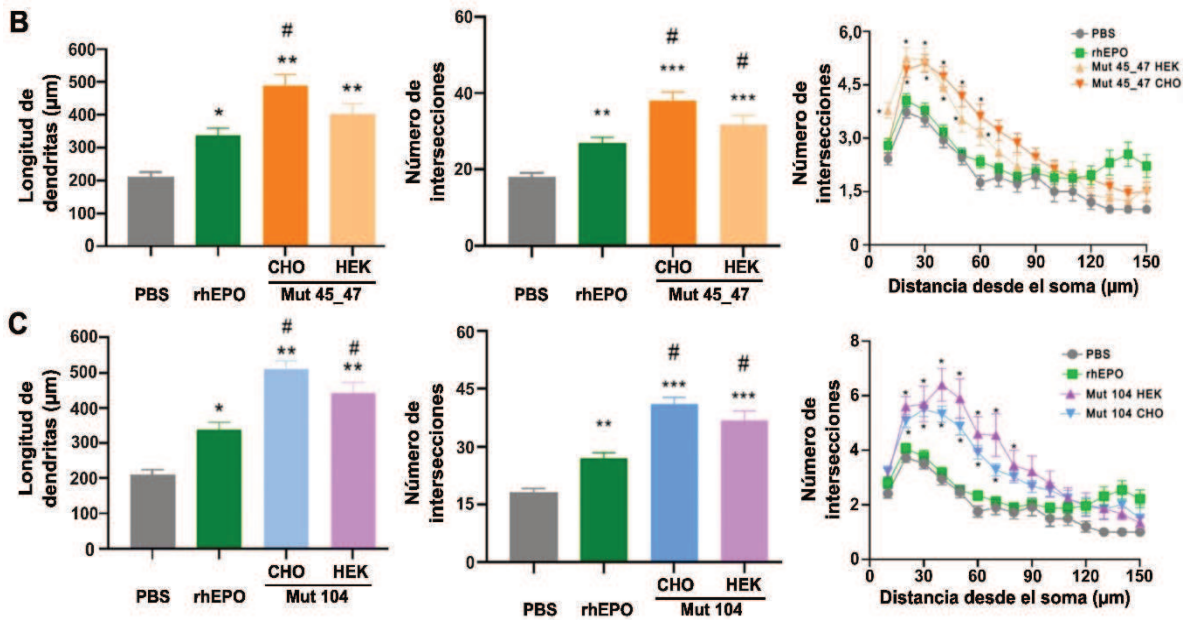
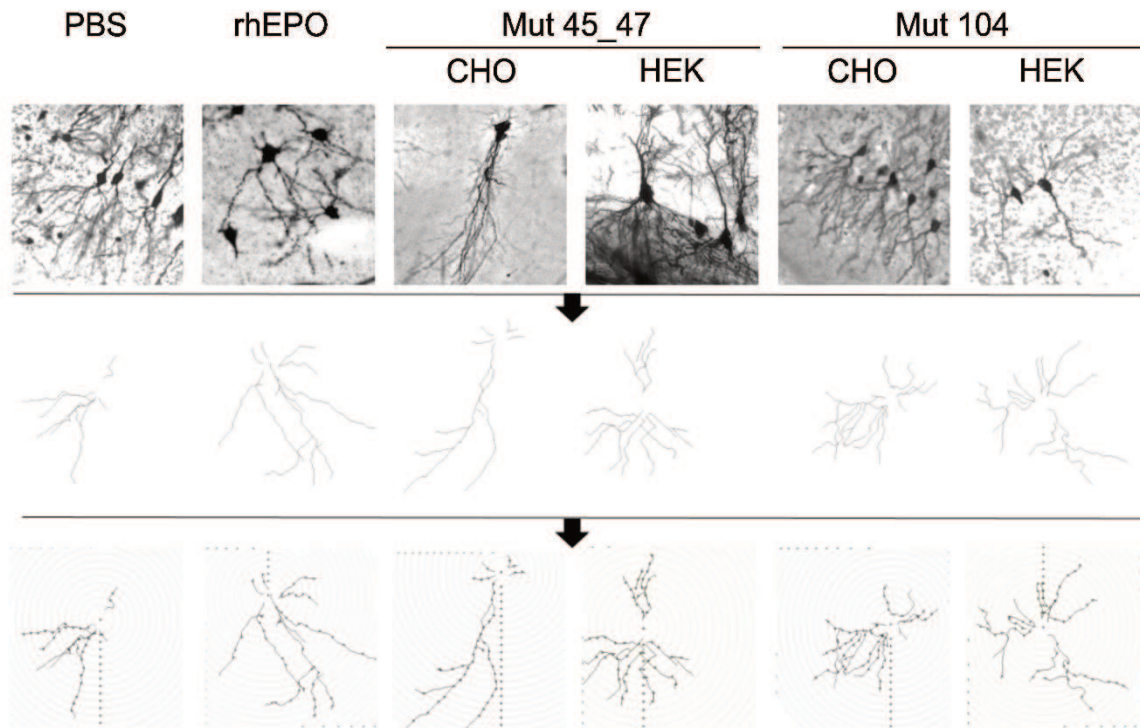


Figura 40. Evaluación de la plasticidad neuronal *in vivo* en ratones CF-1. Se muestran fotos representativas de neuronas teñidas mediante la técnica de Golgi-Cox correspondientes a un área de 250 µm x 250 µm, evaluándose las siguientes muestras: control negativo (PBS), rhEPO y las variantes de hEPO expresadas en diferentes hospedadores (A).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Además, se representa gráficamente los resultados obtenidos a partir de los experimentos de ratones tratados con Mut 45_47 (B) y los tratados con Mut 104 (C) ambas expresadas en distintos hospedadores celulares. Tales representaciones corresponden a dos histogramas donde se grafica la longitud promedio de las dendritas o el número de intersecciones de las neuritas en el análisis de Sholl en función de las muestras estudiadas y un tercer gráfico donde se representa el número de intersecciones de las neuritas en el análisis de Sholl en función de la distancia desde el soma neuronal. Se cuantificó el número de intersecciones con círculos concéntricos separados a intervalos de 10 μm desde el soma. Barra de escala: 50 μm . Los datos se expresan como media \pm SEM de al menos 30 neuronas por grupo. Análisis de la varianza (ANOVA) con corrección de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ de rhEPO y variantes frente a PBS; # $p < 0,05$ de variantes frente a rhEPO.

En la Figura 40 se observa que los grupos tratados con rhEPO y sus variantes exhibieron aumentos estadísticamente significativos en la longitud de las dendritas y el número de intersecciones desde el soma en las neuronas piramidales del hipocampo con respecto al grupo control negativo (PBS). Este resultado permite confirmar que tanto la molécula original como sus muteínas producidas por células CHO y HEK, luego de ser administradas por vía ip e ingresar al sistema circulatorio, fueron capaces de proveer respuesta neuroplástica. Estos resultados se encuentran en concordancia con numerosos reportes bibliográficos en los cuales se han evaluado *in vivo* diferentes aspectos del proceso de neuroplasticidad en la región del hipocampo utilizando una dosis de 42 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de rhEPO y CEPO administrada por vía ip, que resulta muy similar a la dosis utilizada en la presente tesis (50 $\mu\text{g.kg}^{-1}$). El trabajo realizado por Almaguer-Melian y col. [159] demostró que la rhEPO desencadena mecanismos moleculares que permiten modular la plasticidad sináptica en neuronas ubicadas en la región del giro dentado del hipocampo de ratas Wistar. Además, en modelos animales de ratones tales como los de la cepa C57BL/6, Dong Hoon Oh y col. [160] evidenciaron un efecto promotor de rhEPO y CEPO sobre la elongación de las dendritas de neuronas ubicadas en la región CA1 del hipocampo. Otros estudios utilizando esta misma cepa murina han puesto de manifiesto la actividad estimuladora de rhEPO con relación a la neuritogénesis [161], la formación de espinas dendríticas (similar al aumento de la densidad de filopodios) [162] y la sinaptogénesis [163] en neuronas piramidales ubicadas en la región CA1 del hipocampo, procesos que fueron evaluados *in vitro* en la presente tesis de posgrado.

Asimismo, ambas variantes producidas en células CHO mostraron un aumento significativo de los parámetros estudiados *in vivo* en comparación con el grupo rhEPO. En el caso de las variantes producidas en células HEK, se observó el mismo comportamiento con excepción de la longitud dendrítica en la Mut 104 que no fue estadísticamente significativa en comparación con rhEPO. Para cuantificar la complejidad dendrítica se utilizó el análisis

de Sholl midiendo el número de intersecciones dendríticas a distancias crecientes del soma. La cuantificación reveló un aumento estadísticamente significativo en el número de intersecciones para las variantes Mut 45_47 y Mut 104 en las dendritas de las variantes derivadas de CHO y HEK en comparación con el de ratones tratados con rhEPO y PBS. Estos resultados concuerdan con los resultados de los estudios *in vitro* previos, lo que respalda que las variantes hiperglicosiladas promueven la morfogénesis neuronal con mayor eficacia y complejidad que la rhEPO sin que existan diferencias significativas entre distintos hospedadores para producción de la misma variante. Una posible explicación de la mayor eficacia en términos de neuroplasticidad *in vivo* de las variantes de hEPO podría relacionarse con la capacidad de interacción entre las distintas proteínas y los diferentes receptores. Desde el punto de vista estructural-funcional, las mutaciones introducidas en la secuencia original de la molécula de hEPO fueron diseñadas específicamente en residuos críticos para la interacción con el receptor homodimérico, según lo descrito en la bibliografía [57–58], evitando alterar la región molecular asociada con la actividad neurobiológica. Estas mutaciones, localizadas en una hélice α distinta de aquella vinculada a la interacción entre hEPO y el receptor heterodimérico, incorporaron un nuevo sitio consenso de N-glicosilación. Dicho sitio introdujo un N-glicano —una estructura de radio hidrodinámico considerable o voluminosa— capaz de provocar el impedimento estérico en la interacción entre la región responsable de la eritropoyesis con el receptor homodimérico. De este modo, incluso en condiciones donde los glicanos menos complejos presentes en las muteínas producidas por células HEK pudieran aumentar la afinidad global por los receptores, la interacción con el receptor homodimérico permaneció bloqueada por la propia estrategia del diseño, mientras que la unión al receptor heterodimérico se conservó. De este modo, mientras que rhEPO es capaz de interaccionar y activar tanto el receptor homodimérico (EPOR₂) como el heterodimérico (EPOR/ β cR), las muteínas de hEPO solo podrían realizarlo con este último. Es decir que la rhEPO se iría consumiendo o titulando en la interacción con el receptor homodimérico mientras que las variantes lo harían exclusivamente con el heterodimérico. Esto determina que, para una dosis equivalente, un mayor número de moléculas sea capaz de interaccionar con el receptor heterodimérico y, por lo tanto, las muteínas sean más eficientes para desencadenar la respuesta neurobiológica (en comparación con la molécula sin modificar) y que, de acuerdo con la bibliografía [138,164–167], podría correlacionarse con una actividad cognitiva superior. Por otra parte, en este estudio no se observaron diferencias significativas entre las variantes producidas por los distintos linajes celulares. Teniendo en cuenta que las muteínas

producidas en células HEK presentan una mayor depuración sistémica que aquellas expresadas en células CHO, las mismas podrían atravesar con mayor eficiencia la BHE resultando en un inicio de acción más rápido. Por el contrario, las muteínas provenientes de células CHO tienen una vida media en sangre más prolongada, aunque posiblemente enfrentan una mayor dificultad para atravesar la BHE como consecuencia de las características de sus glicanos. Estas situaciones opuestas podrían explicar la neuroplasticidad comparable observada *in vivo* a pesar de sus diferentes perfiles farmacocinéticos, realzando a la línea celular HEK como plataforma de elección para la producción de variantes de hEPO hiperglicosiladas como candidatos para el tratamiento de patologías asociadas al SNC.

5. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

El tratamiento de patologías asociadas al SNC requiere del desarrollo de candidatos terapéuticos que ataquen puntos claves de estas enfermedades, no sólo disminuyendo o controlando los síntomas, sino deteniendo su progresión. En los últimos años, la hEPO ha cobrado especial relevancia debido a sus propiedades neurobiológicas, dentro de las que se destacan la neuroprotección, neurogénesis y neuroplasticidad. Con el objetivo de explotar selectivamente estas propiedades, sin los efectos asociados a la actividad eritropoyética, se han desarrollado distintos análogos de hEPO mediante la aplicación de técnicas tales como la transformación química, la modificación del contenido de ácido siálico o el empleo de técnicas de ADN recombinante.

Con relación a lo último, previamente en nuestro laboratorio se generaron 12 variantes de hEPO mediante glicoingeniería por hiperglicosilación utilizando la línea celular CHO.K1 como plataforma de producción. Para ello, mediante mutagénesis sitio-dirigida se realizaron modificaciones en la región molecular responsable de la actividad eritropoyética, incorporando un sitio consenso de N-glicosilación, con el objetivo de obtener variantes que preserven la actividad neuroplástica pero exhiban reducida o nula actividad eritropoyética. Parte de este trabajo de tesis se centró en la producción, purificación y caracterización fisicoquímica y biológica de todas las variantes para seleccionar los candidatos más promisorios para expresarlos en las células de origen humano HEK-293 y estudiar las propiedades de estas variantes en comparación con las mismas muteínas producidas en células CHO.K1. Con excepción de la variante Mut 15_17, el resto de las muteínas se purificaron de manera exitosa, obteniendo eluatos con purezas superiores al 84%. Cabe mencionar que, si bien la CIA no constituye un proceso adecuado en un proceso *downstream* para la obtención de bioterapéuticos, en esta instancia representó una estrategia muy útil para poder obtener a las variantes con un elevado grado de pureza en un único paso cromatográfico y con masas adecuadas para su caracterización. La evaluación fisicoquímica y biológica permitió seleccionar las 2 muteínas más promisorias, denominadas Mut 45_47 y Mut 104. Estas variantes mostraron la incorporación de un cuarto sitio de N-glicosilación, una masa molecular superior y un mayor número de isoformas más ácidas que rhEPO. Asimismo, al analizar su estructura y estabilidad térmica, ambas demostraron un adecuado plegamiento con estructuras secundarias y terciarias similares a rhEPO. En cuanto a su función biológica, se confirmó el bloqueo de la actividad eritropoyética tanto *in vitro* como *in vivo* para ambas proteínas y la preservación de la actividad neurobiológica, medida *in vitro* como su capacidad neuritogénica. El resto de las variantes producidas fueron descartadas por preservar parte de la función eritropoyética

CONCLUSIONES

(Mut 49, Mut 62_64, Mut 72_74, Mut 149), por presentar problemas para su obtención en condiciones puras (Mut 15_17, Mut 98_100) o por presentar un estado de plegamiento inadecuado (proteínas mal plegadas, inestablemente plegadas o desplegadas), es decir, una estructura proteica comprometida (Mut 62_64, Mut 65_57, Mut 76_78, Mut 106_108, Mut 149 y Mut 151_153).

Las variantes Mut 45_47 y Mut 104 demostraron las características más apropiadas para su expresión mediante el empleo de la línea celular HEK. La elección de esta plataforma productiva tuvo el objetivo de generar variantes que exhiban similitud con la hEPO expresada fisiológicamente por neuronas y astrocitos, caracterizada por la presencia de estructuras glicosídicas más simples, menor contenido de AS, ausencia de los epitopes inmunogénicos Neu5Gc y Gal α 1,3Gal y mayor capacidad de interacción con el receptor heterodimérico. En este sentido, las líneas celulares recombinantes productoras de forma estable de las muteínas mencionadas fueron utilizadas para su producción y la siguiente purificación mediante CIA, lo que generó moléculas con una pureza superior al 92%. El análisis fisicoquímico permitió demostrar claras diferencias entre las variantes producidas por la línea celular HEK y las correspondientes a la línea celular CHO. De este modo, las muteínas producidas por células HEK exhibieron menor MM y, considerando la ocupación completa de los sitios de N-glicosilación, estas diferencias se correlacionan con el menor contenido de AS y el perfil de glicoisofomas menos ácido observado por IEF.

Un aspecto muy importante en esta comparación se relaciona con la detección de la variante de ácido siálico potencialmente inmunogénica (Neu5Gc) en las células CHO mientras que sus niveles no fueron detectables en las moléculas obtenidas a partir de la expresión en células HEK. Desde el punto de vista estructural, Mut 45_47 y Mut 104 derivadas de ambas líneas celulares exhibieron una T_M similar a rhEPO, por lo tanto, las diferencias en los perfiles de glicosilación no se tradujeron en una modificación en su conformación y, consecuentemente, sobre su estructura terciaria.

La caracterización biológica *in vitro* de las muteínas derivadas de células humanas confirmó el bloqueo completo de la AE y la conservación de la AN con relación a los procesos de neuritogénesis, formación de filopodios y sinaptogénesis, coincidentes con aquellos obtenidos para las variantes producidas en células CHO. Adicionalmente, se observó que las muteínas fueron más eficientes que rhEPO para estimular la sinaptogénesis *in vitro*.

En los ensayos *in vivo*, las diferencias observadas en el grado de glicosilación se tradujeron en grandes modificaciones en los perfiles farmacocinéticos. En términos generales, las variantes producidas en células CHO permanecieron en circulación durante tiempo más

CONCLUSIONES

prolongado en comparación con sus análogos producidos en células HEK, que solo pudieron ser detectadas hasta 24 h posinyección. Esto se correlacionaría con una mayor eliminación hepática a través de la captación por los receptores de asialoglicoproteínas dado el menor contenido de ácido siálico y a una mayor eliminación renal mediante filtración glomerular debido al menor radio hidrodinámico como consecuencia de estructuras glicosídicas menos complejas. Particularmente, la Mut 104 CHO exhibió un perfil similar a rhEPO a pesar de contar con un sitio adicional de N-glicosilación, como consecuencia de un efecto de compensación entre sus isoformas más ácidas que tienden a prolongar el tiempo en circulación plasmática y las menos sialidades que lo disminuyen.

Teniendo en cuenta los parámetros más importantes, las variantes derivadas de células humanas demostraron una mayor velocidad de depuración plasmática y menor vida media, resultado previsible en función de sus estructuras glicosídicas menos complejas -características de las células HEK- y a su menor contenido de ácido siálico. Asimismo, estas muteínas exhibieron un mayor volumen de distribución aparente, lo que estaría relacionado con su salida del sistema circulatorio hacia los tejidos periféricos. De este modo, tanto Mut 45_47 como Mut 104 podrían atravesar la BHE y alcanzar el SNC para desencadenar la respuesta neurobiológica, de manera análoga a distintas variantes reportadas en la bibliografía como la asialoEPO.

Finalmente, el estudio de la actividad neuroplástica *in vivo* mostró que las modificaciones contenidas en ambas variantes expresadas por los dos hospedadores celulares estudiados, no afectaron negativamente su AN, sino que, contrariamente, la misma se manifestó de manera más eficiente que la correspondiente a rhEPO confirmando la tendencia observada en la evaluación *in vitro*. Esta mejora podría asociarse, por un lado, a un incremento en la afinidad al receptor heterodimérico (manifestado por la mejora en la actividad biológica evaluada *in vitro*) y, por el otro, con la capacidad de ambas para interactuar sólo con el receptor heterodimérico diferenciándose de rhEPO que lo estaría haciendo con ambos receptores (homodimérico y heterodimérico). De este modo, ante masas equivalentes de proteínas, las variantes de hEPO tendrían mayor disponibilidad para desencadenar una respuesta neurobiológica más eficiente.

Finalmente, la aplicación de la estrategia de glicoingeniería por hiperglicosilación junto con la selección de una línea celular derivada de células humanas como sistema de expresión permitieron obtener variantes de hEPO sin actividad eritropoyética y mejorada función neurobiológica con respecto a la molécula original. Estas muteínas además tendrían un perfil de glicosilación con mayor similitud la hEPO producida fisiológicamente en el SNC,

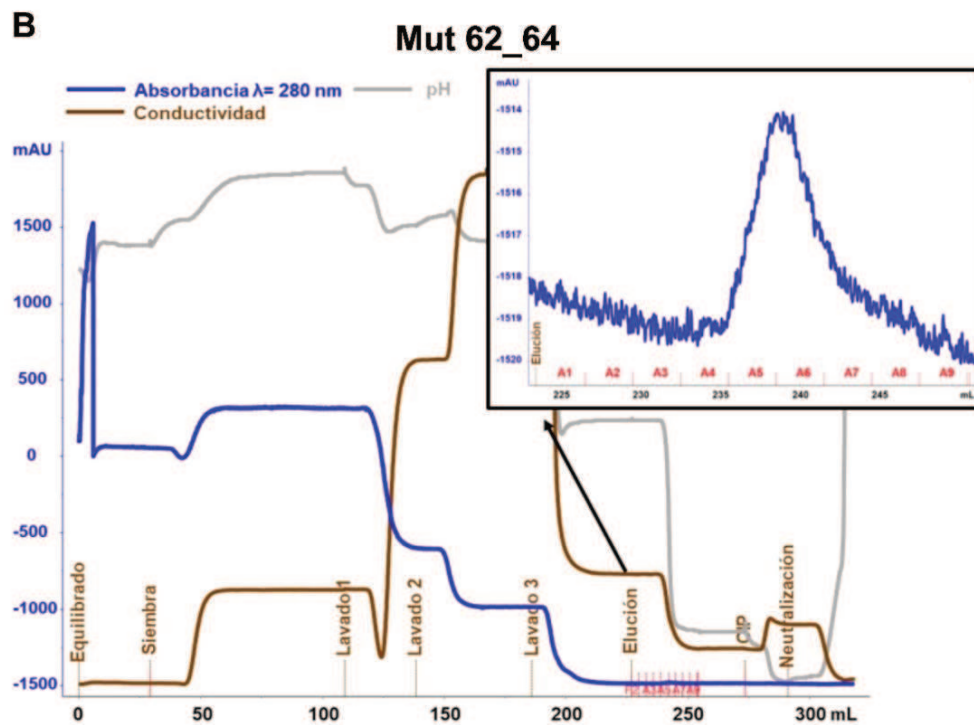
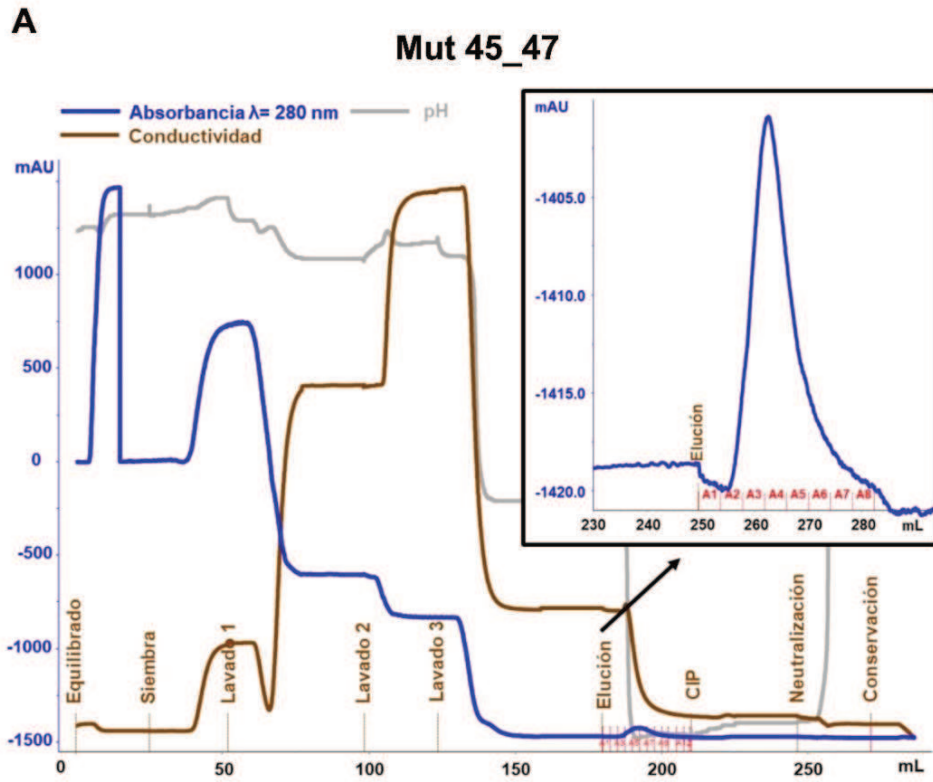
CONCLUSIONES

caracterizado por glicanos con menor grado de antenaridad y sialidación junto con la ausencia de residuos glicosídicos inmunogénicos, lo que representan ventajas funcionales significativas en comparación con los derivados desarrollados previamente. Incluso, a pesar de su mayor velocidad de depuración plasmática, son capaces de alcanzar el SNC y desencadenar la respuesta de forma más eficiente que rhEPO. Estas propiedades, que potencian su desempeño terapéutico, destacan a la línea celular HEK-293 como una plataforma ideal para la producción de análogos de hEPO, los cuales representan prometedores candidatos para el tratamiento de patologías asociadas al SNC.

6. ANEXO

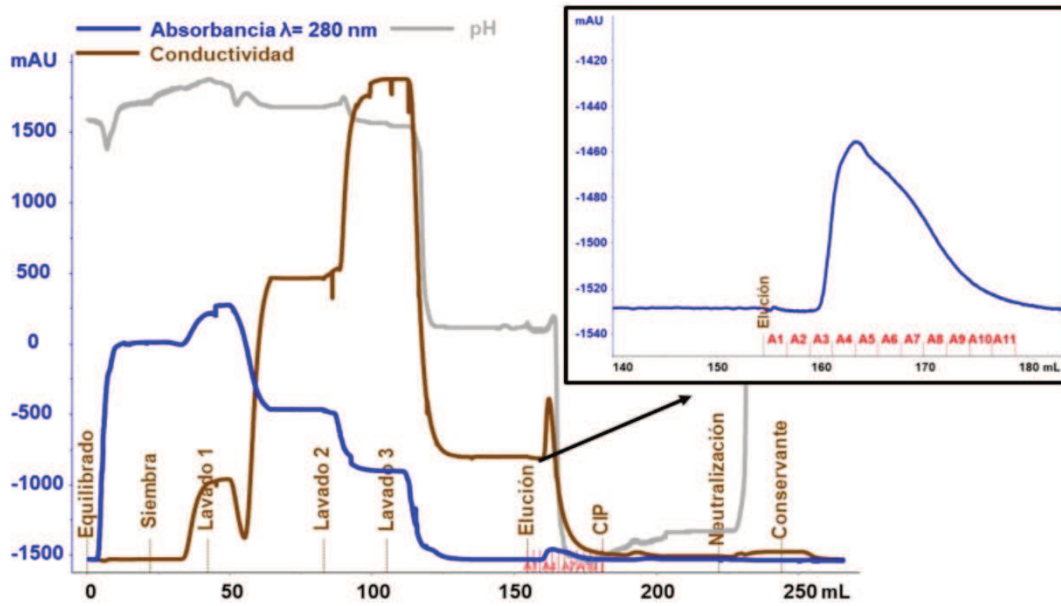
Esta sección presenta reiteraciones ampliadas de los cromatogramas obtenidos durante los procedimientos cromatográficos empleados para la purificación de las variantes de hEPO producidas por ambas líneas celulares. En cada cromatograma se representan las señales de detección de absorbancia a $\lambda = 280$ nm (azul), de pH (gris) y de conductividad (marrón) en función del volumen de elución. Las líneas perpendiculares al eje de las abscisas señalan el inicio de cada una de las etapas del proceso cromatográfico. En el recuadro ubicado en el margen superior derecho de cada figura se incluye una ampliación del pico de elución, en la cual se indican las fracciones recolectadas (rojo).

Es pertinente señalar que la sección del cromatograma correspondiente a la etapa de segunda elución se muestra identificada como *CIP* (del inglés, *Cleaning in Place*), denominación asignada automáticamente por el software del cromatógrafo.



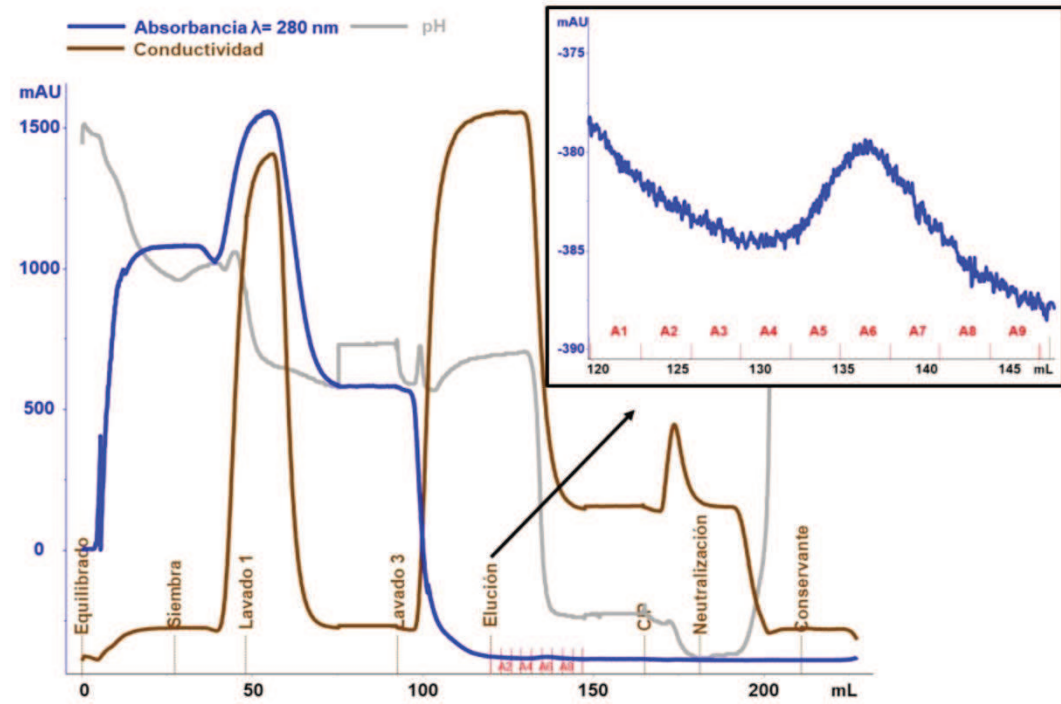
C

Mut 65_67



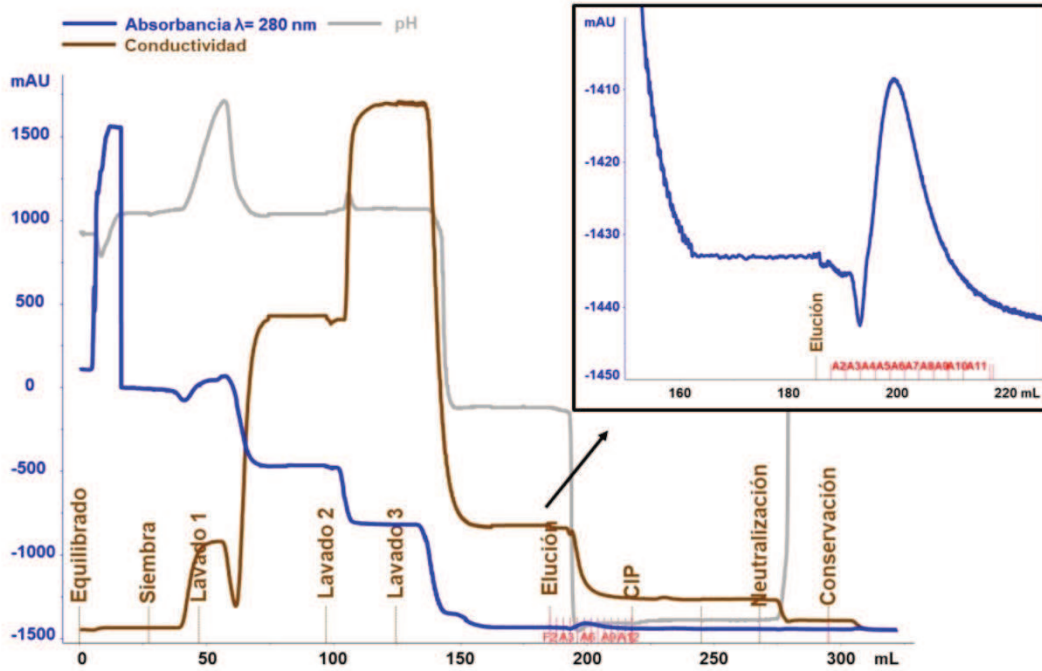
D

Mut 72_74



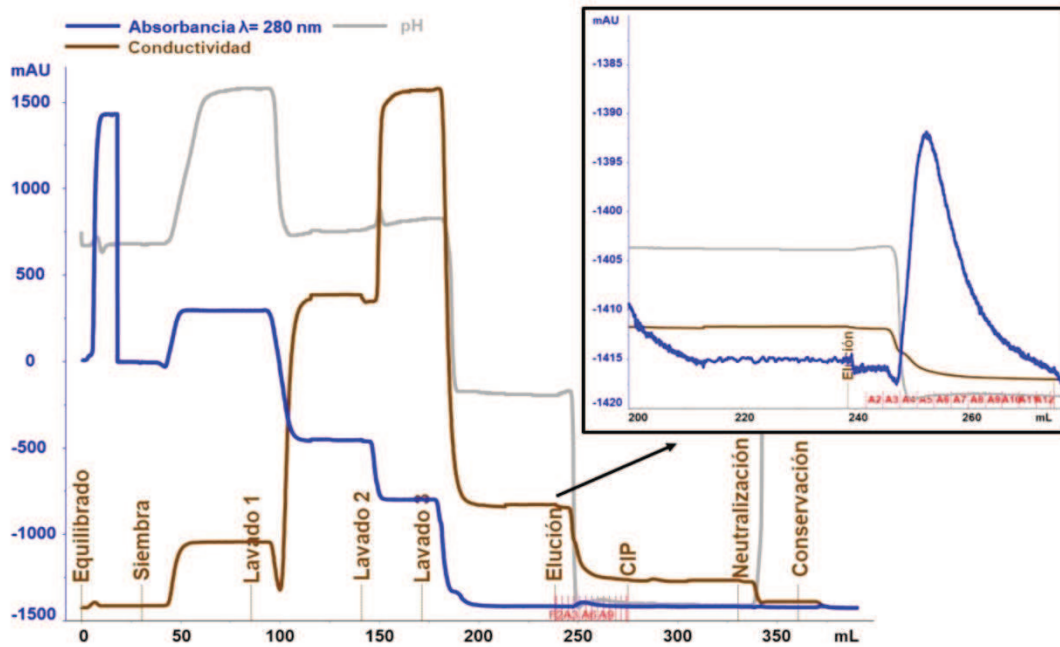
E

Mut 76_78



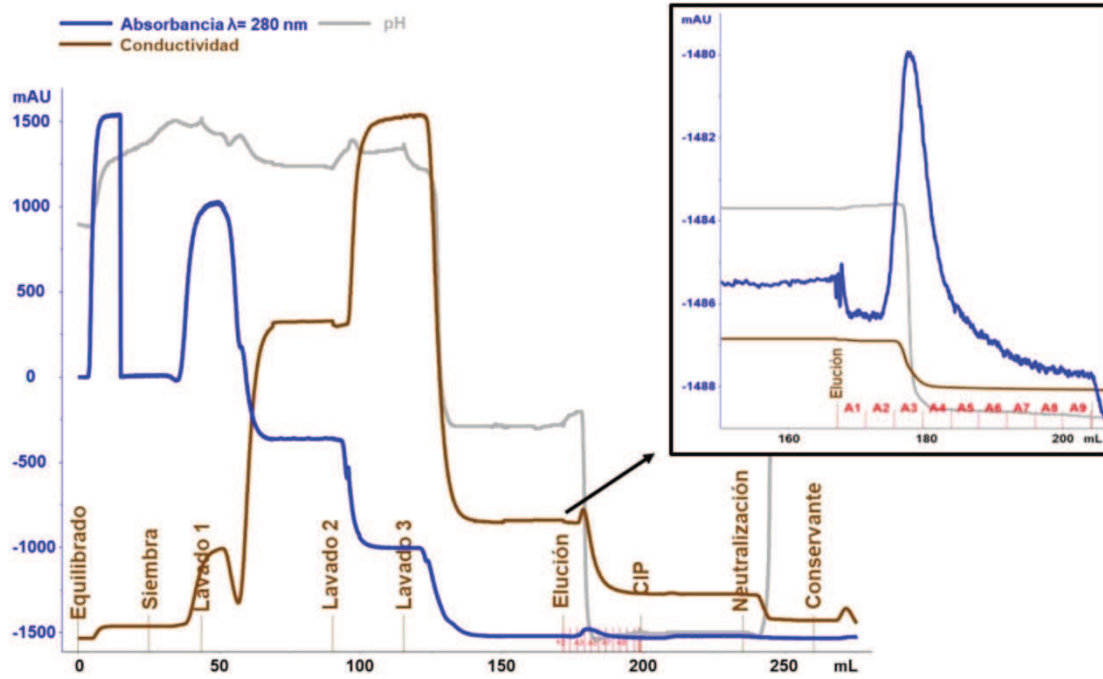
F

Mut 98_100



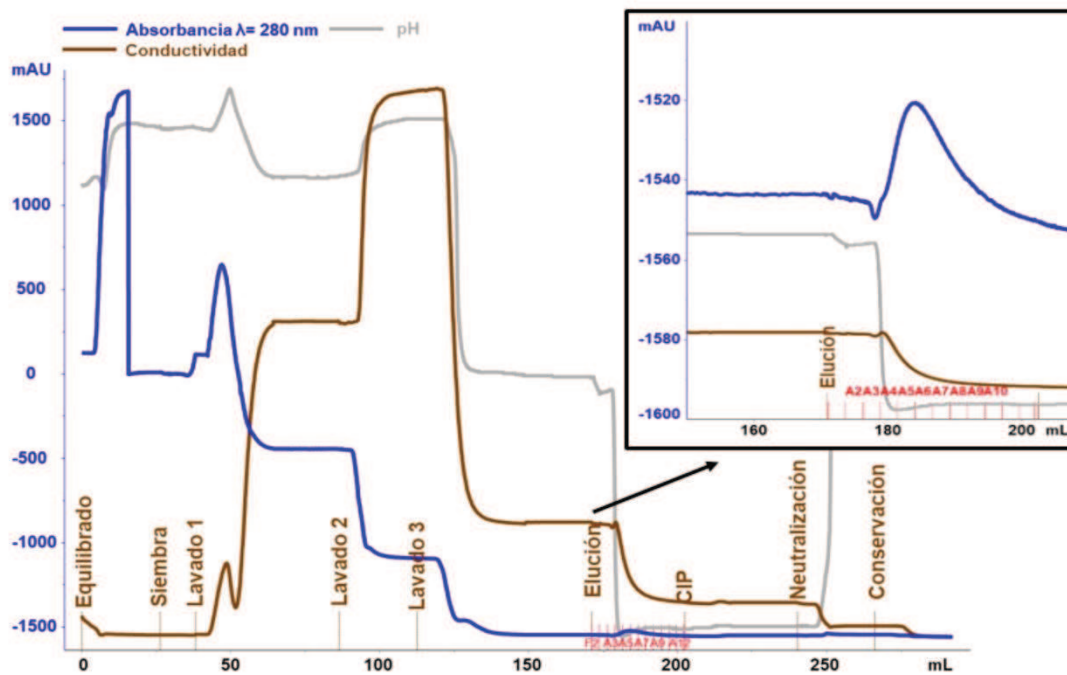
G

Mut 104



H

Mut 106_108



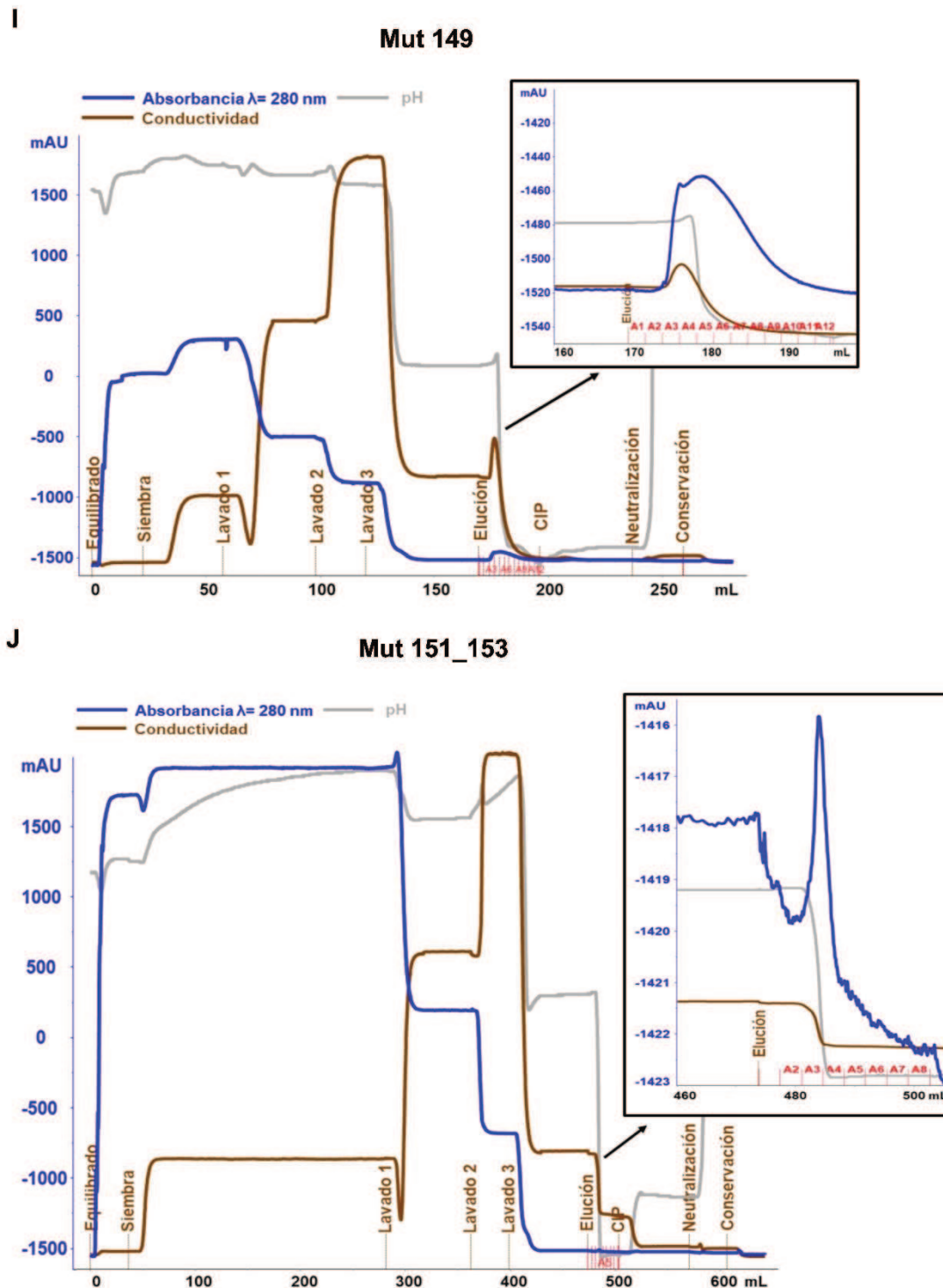


Figura A1: Cromatogramas ampliados correspondientes a los procedimientos de purificación de cada muteína mediante CIA, según consta en la Figura 18 del manuscrito (pág. 94).

Muteínas: Mut 45_47 (A), Mut 62_64 (B), Mut 65_67 (C), Mut 72_74 (D), Mut 76_78 (E), Mut 98_100 (F), Mut 104 (G), Mut 106_108 (H), Mut 149 (I) y Mut 151_153 (J).

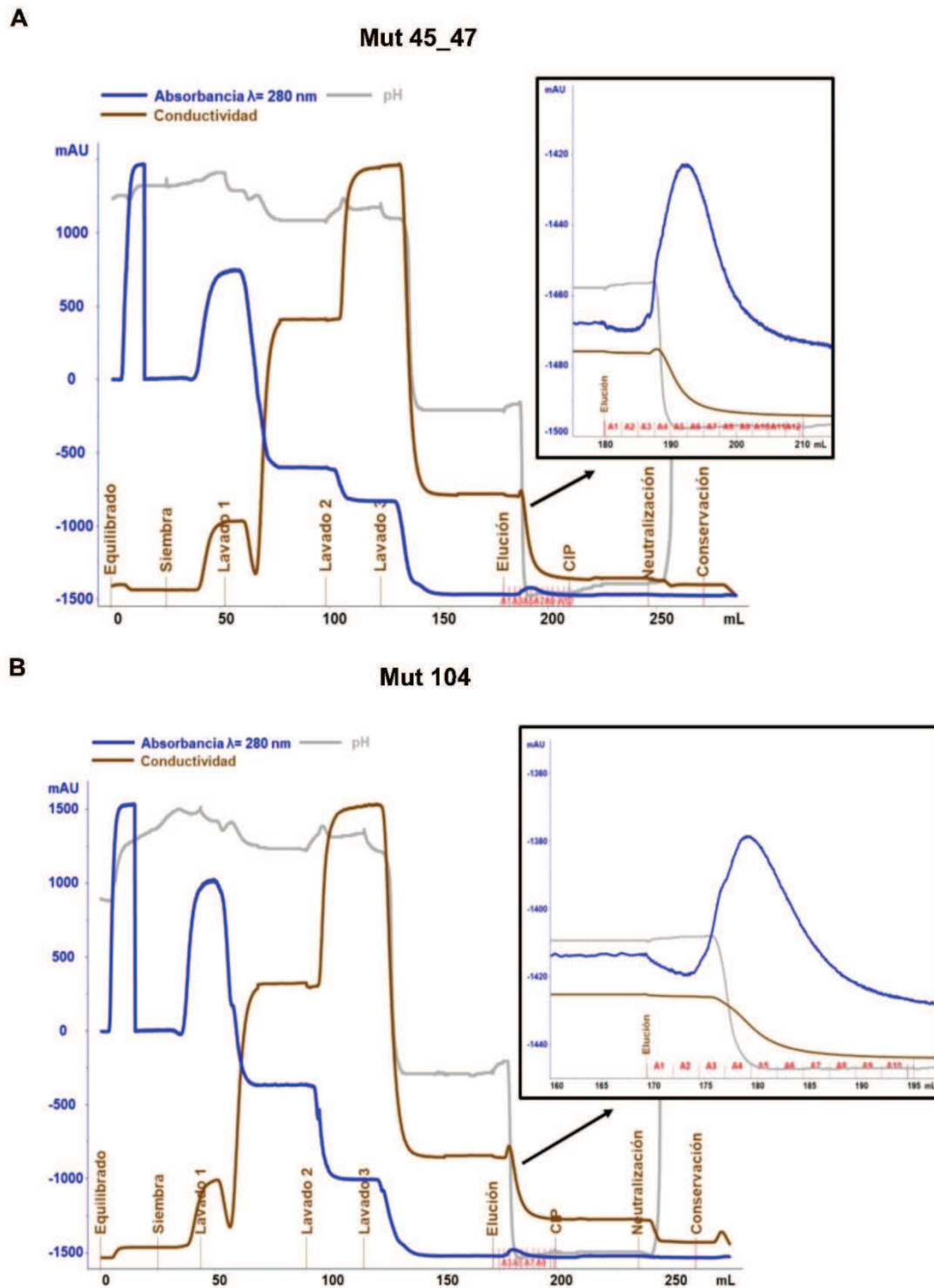


Figura A2: Cromatogramas ampliados correspondientes a los procedimientos de purificación mediante CIA de las muteínas Mut 45_47 (A) y Mut 104 (B) producidas en células HEK, según consta en la Figura 27 del manuscrito (pág. 111).

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Walsh G, Walsh E. Biopharmaceutical benchmarks 2022. *Nat Biotechnol.* 2022 Dec;40(12):1722–60.
2. Oggero, M., Forno, G. Glicoproteínas terapéuticas. Santa Fe, Argentina: ediciones UNL; 2021. Cap. 7 p. 151-152.
3. Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv.* 2009 May;27(3):297–306.
4. Tihanyi B, Nyitray L. Recent advances in CHO cell line development for recombinant protein production. *Drug Discov Today Technol.* 2020 Dec;38:25–34.
5. Tan E, Chin CSH, Lim ZFS, Ng SK. HEK293 Cell Line as a Platform to Produce Recombinant Proteins and Viral Vectors. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021 Dec 13;9.
6. Papaioannou I, Owen JS, Yáñez-Muñoz RJ. Clinical applications of gene therapy for rare diseases: A review. *Int J Exp Pathol.* 2023 Aug;104(4):154–76.
7. Bueren JA, Auricchio A. Advances and Challenges in the Development of Gene Therapy Medicinal Products for Rare Diseases. *Hum Gene Ther.* 2023 Sep 1;34(17–18):763–75.
8. Dumont J, Eewart D, Mei B, Estes S, Kshirsagar R. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Crit Rev Biotechnol.* 2016 Nov 1;36(6):1110–22.
9. Wong CH. Protein Glycosylation: New Challenges and Opportunities. *J Org Chem.* 2005 May 1;70(11):4219–25.
10. Spiro RG. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology.* 2002 Apr 1;12(4):43R-56R.
11. Solá RJ, Griebenow K. Glycosylation of Therapeutic Proteins: An Effective Strategy to Optimize Efficacy. *BioDrugs.* 2010 Feb;24(1):9–21.
12. Oggero, M., Forno, G. Glicoproteínas terapéuticas. Santa Fe, Argentina: ediciones UNL; 2021. Cap. 5 p. 102-107.
13. Raman R, Raguram S, Venkataraman G, Paulson JC, Sasisekharan R. Glycomics: an integrated systems approach to structure-function relationships of glycans. *Nat Methods.* 2005 Nov;2(11):817–24.
14. Costa AR, Rodrigues ME, Henriques M, Oliveira R, Azeredo J. Glycosylation: impact, control and improvement during therapeutic protein production. *Crit Rev Biotechnol.* 2014 Dec;34(4):281–99.
15. Dicker M, Strasser R. Using glyco-engineering to produce therapeutic proteins. *Expert Opin Biol Ther.* 2015 Oct 3;15(10):1501–16.

16. Jensen PH, Kolarich D, Packer NH. Mucin-type O-glycosylation – putting the pieces together. *FEBS J.* 2010 Jan;277(1):81–94.
17. Sinclair AM, Elliott S. Glycoengineering: The effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins. *J Pharm Sci.* 2005 Aug;94(8):1626–35.
18. Ruiz-Garcia A, Bermejo M, Moss A, Casabo VG. Pharmacokinetics in Drug Discovery. *J Pharm Sci.* 2008 Feb;97(2):654–90.
19. Daniels BS, Deen WM, Mayer G, Meyer T, Hostetter TH. Glomerular permeability barrier in the rat. Functional assessment by in vitro methods. *J Clin Invest.* 1993 Aug 1;92(2):929–36.
20. Kimchi-Sarfaty C, Schiller T, Hamasaki-Katagiri N, Khan MA, Yanover C, Sauna ZE. Building better drugs: developing and regulating engineered therapeutic proteins. *Trends Pharmacol Sci.* 2013 Oct;34(10):534–48.
21. Steirer LM, Park EI, Townsend RR, Baenziger JU. The Asialoglycoprotein Receptor Regulates Levels of Plasma Glycoproteins Terminating with Sialic Acid α 2,6-Galactose. *J Biol Chem.* 2009 Feb;284(6):3777–83.
22. Paul A, Segal D, Zacco E. Glycans to improve efficacy and solubility of protein aggregation inhibitors. *Neural Regen Res.* 2021;16(11):2215.
23. Goth CK, Vakhrushev SY, Joshi HJ, Clausen H, Schjoldager KT. Fine-Tuning Limited Proteolysis: A Major Role for Regulated Site-Specific O-Glycosylation. *Trends Biochem Sci.* 2018 Apr;43(4):269–84.
24. He M, Zhou X, Wang X. Glycosylation: mechanisms, biological functions and clinical implications. *Signal Transduct Target Ther.* 2024 Aug 5;9(1).
25. Gomes Ferreira I, Pucci M, Venturi G, Malagolini N, Chiricolo M, Dall'Olio F. Glycosylation as a Main Regulator of Growth and Death Factor Receptors Signaling. *Int J Mol Sci.* 2018 Feb 15;19(2):580.
26. Martina CE, Crowe JE, Meiler J. Glycan masking in vaccine design: Targets, immunogens and applications. *Front Immunol.* 2023 Mar 23;14.
27. Mastrangeli R, Audino MC, Palinsky W, Broly H, Bierau H. Current views on N-glycolylneuraminic acid in therapeutic recombinant proteins. *Trends Pharmacol Sci.* 2021 Nov;42(11):943–56.
28. Tangvoranuntakul P, Gagneux P, Diaz S, Bardor M, Varki N, Varki A, et al. Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid. *Proc Natl Acad Sci.* 2003 Oct 14;100(21):12045–50.

29. Nguyen DH, Tangvoranuntakul P, Varki A. Effects of Natural Human Antibodies against a Nonhuman Sialic Acid That Metabolically Incorporates into Activated and Malignant Immune Cells. *J Immunol.* 2005 Jul 1;175(1):228–36.
30. Ghaderi D, Zhang M, Hurtado-Ziola N, Varki A. Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 2012 Jan;28(1):147–76.
31. Ritacco FV, Wu Y, Khetan A. Cell culture media for recombinant protein expression in Chinese hamster ovary (CHO) cells: History, key components, and optimization strategies. *Biotechnol Prog.* 2018 Nov;34(6):1407–26.
32. Beals JM, Shanafelt AB. Enhancing exposure of protein therapeutics. *Drug Discov Today Technol.* 2006 Mar;3(1):87–94.
33. Egrie JC, Dwyer E, Browne JK, Hitz A, Lykos MA. Darbepoetin alfa has a longer circulating half-life and greater in vivo potency than recombinant human erythropoietin. *Exp Hematol.* 2003 Apr;31(4):290–9.
34. Ceaglio N, Etcheverrigaray M, Kratje R, Oggero M. Novel long-lasting interferon alpha derivatives designed by glycoengineering. *Biochimie.* 2008 Mar;90(3):437–49.
35. Trousdale RK, Yu B, Pollak SV, Husami N, Vidali A, Lustbader JW. Efficacy of native and hyperglycosylated follicle-stimulating hormone analogs for promoting fertility in female mice. *Fertil Steril.* 2009 Jan;91(1):265–70.
36. Sales MDLM, Kratje R, Oggero M, Ceaglio N. Bifunctional GM-CSF-derived peptides as tools for O-glycoengineering and protein tagging. *J Biotechnol.* 2021 Feb;327:18–27.
37. Villaraza J, Antuña S, Tardivo MB, Rodríguez MC, Díaz PU, Notaro US, et al. Development of a biotechnology process for the production of a novel hyperglycosylated long-acting recombinant bovine follicle-stimulating hormone. *Biotechnol J.* 2024 Jun;19(6).
38. Iturraspe F. Tesina de Licenciatura en Biotecnología: Glicoingeniería de hIFN- α 2b: Producción de variantes terapéuticas altamente O-glicosiladas empleando un nuevo péptido derivado del GM-CSF humano. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL, Argentina; 2019.
39. Andjelkovic AV, Keep RF, Wang MM. Molecular Mechanisms of Cerebrovascular Diseases. *Int J Mol Sci.* 2022 Jun 28;23(13):7161.
40. Feigin VL, Brainin M, Norrving B, Martins SO, Pandian J, Lindsay P, et al. World Stroke Organization: Global Stroke Fact Sheet 2025. *Int J Stroke.* 2025 Feb;20(2):132–44.

41. Kleindorfer DO, Towfighi A, Chaturvedi S, Cockroft KM, Gutierrez J, Lombardi-Hill D, et al. 2021 Guideline for the Prevention of Stroke in Patients With Stroke and Transient Ischemic Attack: A Guideline From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2021 Jul;52(7).
42. Stephenson J, Nutma E, Van Der Valk P, Amor S. Inflammation in CNS neurodegenerative diseases. *Immunology*. 2018 Jun;154(2):204–19.
43. Luetic G, Menichini ML. Multiple sclerosis prevalence in Santa Fe province, Argentina. *Mult Scler Relat Disord*. 2020 Jun;41:102006.
44. Gadhave DG, Sugandhi VV, Jha SK, Nangare SN, Gupta G, Singh SK, et al. Neurodegenerative disorders: Mechanisms of degeneration and therapeutic approaches with their clinical relevance. *Ageing Res Rev*. 2024 Aug;99:102357.
45. Eftekharzadeh B, Hyman BT, Wegmann S. Structural studies on the mechanism of protein aggregation in age related neurodegenerative diseases. *Mech Ageing Dev*. 2016 Jun;156:1–13.
46. Luo Y, Qiao L, Li M, Wen X, Zhang W, Li X. Global, regional, national epidemiology and trends of Parkinson's disease from 1990 to 2021: findings from the Global Burden of Disease Study 2021. *Front Aging Neurosci*. 2025 Jan 10;16.
47. Li X, Feng X, Sun X, Hou N, Han F, Liu Y. Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990–2019. *Front Aging Neurosci*. 2022 Oct 10;14.
48. Lacombe C, Mayeux P. The molecular biology of erythropoietin. *Nephrol Dial Transplant*. 1999;14(2):22–8.
49. Law ML, Cai GY, Lin FK, Wei Q, Huang SZ, Hartz JH, et al. Chromosomal assignment of the human erythropoietin gene and its DNA polymorphism. *Proc Natl Acad Sci*. 1986 Sep;83(18):6920–4.
50. Sasaki H, Ochi N, Dell A, Fukuda M. Site-specific glycosylation of human recombinant erythropoietin: analysis of glycopeptides or peptides at each glycosylation site by fast atom bombardment-mass spectrometry. *Biochemistry*. 1988 Nov 15;27(23):8618–26.
51. Cowper B, Li X, Yu L, Zhou Y, Fan WH, Rao CM. Comprehensive glycan analysis of twelve recombinant human erythropoietin preparations from manufacturers in China and Japan. *J Pharm Biomed Anal*. 2018 May;153:214–20.
52. Lippold S, Thavarajah R, Reusch D, Wuhler M, Nicolardi S. Glycoform analysis of intact erythropoietin by MALDI FT-ICR mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 2021 Nov;1185:339084.

53. Shahrokh Z, Royle L, Saldiva R, Bones J, Abrahams JL, Artemenko NV, et al. Erythropoietin Produced in a Human Cell Line (Dynepo) Has Significant Differences in Glycosylation Compared with Erythropoietins Produced in CHO Cell Lines. *Mol Pharm.* 2011 Feb 7;8(1):286–96.
54. Boissel JP, Lee WR, Presnell SR, Cohen FE, Bunn HF. Erythropoietin structure-function relationships. Mutant proteins that test a model of tertiary structure. *J Biol Chem.* 1993 Jul;268(21):15983–93.
55. Cheatham JC, Smith DM, Aoki KH, Stevenson JL, Hoeffel TJ, Syed RS, et al. NMR structure of human erythropoietin and a comparison with its receptor bound conformation. *Nat Struct Biol.* 1998 Oct;5(10):861–6.
56. Wen D, Boissel JP, Showers M, Ruch BC, Bunn HF. Erythropoietin structure-function relationships. Identification of functionally important domains. *J Biol Chem.* 1994 Sep;269(36):22839–46.
57. Brines M, Patel NSA, Villa P, Brines C, Mennini T, De Paola M, et al. Nonerythropoietic, tissue-protective peptides derived from the tertiary structure of erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci.* 2008 Aug 5;105(31):10925–30.
58. Elliott S, Lorenzini T, Chang D, Barzilay J, Delorme E. Mapping of the Active Site of Recombinant Human Erythropoietin. *Blood.* 1997 Jan 15;89(2):493–502.
59. Jelkmann W. Regulation of erythropoietin production. *J Physiol.* 2011 Mar 15;589(6):1251–8.
60. Tilbrook PA, Klinken SP. Erythropoietin and Erythropoietin Receptor. *Growth Factors.* 1999 Jan;17(1):25–35.
61. Koury S, Bondurant M, Koury M, Semenza G. Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization. *Blood.* 1991 Jun 1;77(11):2497–503.
62. Ebert BL, Bunn HF. Regulation of the Erythropoietin Gene. *Blood.* 1999 Sep 15;94(6):1864–77.
63. Lund A, Lundby C, Olsen NV. High-dose erythropoietin for tissue protection. *Eur J Clin Invest.* 2014 Dec;44(12):1230–8.
64. Messé SR, McGarvey ML, Bavaria JE, Pochettino A, Szeto WY, Cheung AT, et al. A Pilot Study of Darbepoetin Alfa for Prophylactic Neuroprotection in Aortic Surgery. *Neurocrit Care.* 2013 Feb;18(1):75–80.

65. Masuda S, Okano M, Yamagishi K, Nagao M, Ueda M, Sasaki R. A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J Biol Chem*. 1994 Jul;269(30):19488–93.
66. Vittori DC, Chamorro ME, Hernández YV, Maltaner RE, Nesse AB. Erythropoietin and derivatives: Potential beneficial effects on the brain. *J Neurochem*. 2021 Sep;158(5):1032–57.
67. Leist M, Ghezzi P, Grasso G, Bianchi R, Villa P, Fratelli M, et al. Derivatives of Erythropoietin That Are Tissue Protective But Not Erythropoietic. *Science*. 2004 Jul 9;305(5681):239–42.
68. Ogunshola OO, Bogdanova AY. Epo and Non-hematopoietic Cells: What Do We Know? In: Ghezzi P, Cerami A, editors. *Tissue-Protective Cytokines*. Totowa, NJ: Humana Press; 2013. p. 13–41.
69. Ostrowski D, Heinrich R. Alternative Erythropoietin Receptors in the Nervous System. *J Clin Med*. 2018 Feb 2;7(2):24.
70. Dawson TM. Preconditioning-mediated neuroprotection through erythropoietin? *The Lancet*. 2002 Jan;359(9301):96–7.
71. Besarab A, Hörl WH, Silverberg D. Iron Metabolism, Iron Deficiency, Thrombocytosis, and the Cardiorenal Anemia Syndrome. *The Oncologist*. 2009 Sep 1;14(S1):22–33.
72. Sinclair A, Elliott. The effect of erythropoietin on normal and neoplastic cells. *Biol Targets Ther*. 2012 Jun;163.
73. Rey F, Balsari A, Giallongo T, Ottolenghi S, Di Giulio AM, Samaja M, et al. Erythropoietin as a Neuroprotective Molecule: An Overview of Its Therapeutic Potential in Neurodegenerative Diseases. *ASN Neuro*. 2019 Jan;11(1).
74. Genc S, Koroglu TF, Genc K. Erythropoietin and the nervous system. *Brain Res*. 2004 Mar;1000(1–2):19–31.
75. Castillo C, Zaror S, Gonzalez M, Hidalgo A, Burgos CF, Cabezas OI, et al. Neuroprotective effect of a new variant of Epo nonhematopoietic against oxidative stress. *Redox Biol*. 2018 Apr;14:285–94.
76. Chong ZZ, Shang YC, Mu Y, Cui S, Yao Q, Maiese K. Targeting erythropoietin for chronic neurodegenerative diseases. *Expert Opin Ther Targets*. 2013 Sep;17(6):707–20.
77. Hemani S, Lane O, Agarwal S, Yu SP, Woodbury A. Systematic Review of Erythropoietin (EPO) for Neuroprotection in Human Studies. *Neurochem Res*. 2021 Apr;46(4):732–9.

78. Peng B, Kong G, Yang C, Ming Y. Erythropoietin and its derivatives: from tissue protection to immune regulation. *Cell Death Dis.* 2020 Feb 3;11(2).
79. Luo Y, Ali T, Liu Z, Gao R, Li A, Yang C, et al. EPO prevents neuroinflammation and relieves depression via JAK/STAT signaling. *Life Sci.* 2023 Nov;333:122102.
80. Barnes AP, Polleux F. Establishment of Axon-Dendrite Polarity in Developing Neurons. *Annu Rev Neurosci.* 2009 Jun 1;32(1):347–81.
81. Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells. *Annu Rev Neurosci.* 2009 Jun 1;32(1):149–84.
82. Götz M, Huttner WB. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 Oct;6(10):777–88.
83. Paridaen JT, Huttner WB. Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Rep.* 2014 Apr;15(4):351–64.
84. Wang L, Zhang Z, Wang Y, Zhang R, Chopp M. Treatment of Stroke With Erythropoietin Enhances Neurogenesis and Angiogenesis and Improves Neurological Function in Rats. *Stroke.* 2004 Jul;35(7):1732–7.
85. Gonzalez A, Moya-Alvarado G, Gonzalez-Billaut C, Bronfman FC. Cellular and molecular mechanisms regulating neuronal growth by brain-derived neurotrophic factor. *Cytoskeleton.* 2016 Oct;73(10):612–28.
86. Mengozzi M, Cervellini I, Villa P, Erbayraktar Z, Gökmen N, Yilmaz O, et al. Erythropoietin-induced changes in brain gene expression reveal induction of synaptic plasticity genes in experimental stroke. *Proc Natl Acad Sci.* 2012 Jun 12;109(24):9617–22.
87. Ledonne A, Mercuri NB. On the Modulatory Roles of Neuregulins/ErbB Signaling on Synaptic Plasticity. *Int J Mol Sci.* 2019 Dec 31;21(1):275.
88. Xiong T, Yang X, Qu Y, Chen H, Yue Y, Wang H, et al. Erythropoietin induces synaptogenesis and neurite repair after hypoxia ischemia-mediated brain injury in neonatal rats. *NeuroReport.* 2019 Aug 7;30(11):783–9.
89. Duclot F, Kabbaj M. The Role of Early Growth Response 1 (EGR1) in Brain Plasticity and Neuropsychiatric Disorders. *Front Behav Neurosci.* 2017 Mar 6;11.
90. Asadi B, Askari GR, Khorvash F, Bagherpur A, Mehrabi F, Karimi M, et al. Neuroprotective Effects of Erythropoietin in Acute Ischemic Stroke. *Int J Prev Med.* 2013;4.

91. Jang W, Park J, Shin KJ, Kim JS, Kim JS, Youn J, et al. Safety and efficacy of recombinant human erythropoietin treatment of non-motor symptoms in Parkinson's disease. *J Neurol Sci.* 2014 Feb;337(1–2):47–54.
92. Schreiber K, Magyari M, Sellebjerg F, Iversen P, Garde E, Madsen CG, et al. High-dose erythropoietin in patients with progressive multiple sclerosis: A randomized, placebo-controlled, phase 2 trial. *Mult Scler J.* 2017 Apr;23(5):675–85.
93. Pérez L, Sosa S, Valenzuela C, Bringas G, Urrutia N, Peñalver AI, et al. Clinical trial of neuroEPO in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* 2021 Dec;17(S9).
94. Silva I, Alípio C, Pinto R, Mateus V. Potential anti-inflammatory effect of erythropoietin in non-clinical studies in vivo: A systematic review. *Biomed Pharmacother.* 2021 Jul;139:111558.
95. Ma R, Xiong N, Huang C, Tang Q, Hu B, Xiang J, et al. Erythropoietin protects PC12 cells from β -amyloid_{25–35}-induced apoptosis via PI3K/Akt signaling pathway. *Neuropharmacology.* 2009 May;56(6–7):1027–34.
96. Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, Nagao M, et al. *In vivo* evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci.* 1998 Apr 14;95(8):4635–40.
97. Stohlawetz PJ, Dzirlo L, Hergovich N, Lackner E, Mensik C, Eichler HG, et al. Effects of erythropoietin on platelet reactivity and thrombopoiesis in humans. *Blood.* 2000 May 1;95(9):2983–9.
98. Pedroso I, Bringas M, Anubis Aguiar M, Morales L, Valdés P, Álvarez L, et al. Use of Cuban Recombinant Human Erythropoietin in Parkinson's Disease Treatment. *MEDICC Rev.* 2012;14(1):11.
99. Sirén AL, Faßhauer T, Bartels C, Ehrenreich H. Therapeutic Potential of Erythropoietin and its Structural or Functional Variants in the Nervous System. *Neurotherapeutics.* 2009 Jan;6(1):108–27.
100. Boesch S, Nachbauer W, Mariotti C, Sacca F, Filla A, Klockgether T, et al. Safety and tolerability of carbamylated erythropoietin in Friedreich's ataxia. *Mov Disord.* 2014 Jun;29(7):935–9.
101. Brines M. Discovery of a Master Regulator of Injury and Healing: Tipping the Outcome from Damage toward Repair. *Mol Med.* 2014 Jan;20(S1):S10–6.

102. Pankratova S, Kiryushko D, Sonn K, Soroka V, Køhler LB, Rathje M, et al. Neuroprotective properties of a novel, non-haematopoietic agonist of the erythropoietin receptor. *Brain*. 2010 Aug;133(8):2281–94.
103. Swartjes M, Van Velzen M, Niesters M, Aarts L, Brines M, Dunne A, et al. ARA 290, a Peptide Derived from the Tertiary Structure of Erythropoietin, Produces Long-Term Relief of Neuropathic Pain Coupled with Suppression of the Spinal Microglia Response. *Mol Pain*. 2014 Jan 1;10.
104. Chen H, Luo B, Yang X, Xiong J, Liu Z, Jiang M, et al. Therapeutic effects of nonerythropoietic erythropoietin analog ARA290 in experimental autoimmune encephalomyelitis rat. *J Neuroimmunol*. 2014 Mar;268(1–2):64–70.
105. Xu Y, Geng Y, Wang H, Zhang H, Qi J, Li F, et al. Cyclic helix B peptide alleviates proinflammatory cell death and improves functional recovery after traumatic spinal cord injury. *Redox Biol*. 2023 Aug;64:102767.
106. Dmytriyeva O, Belmeguenai A, Bezin L, Soud K, Drucker Woldbye DP, Gøtzsche CR, et al. Short erythropoietin-derived peptide enhances memory, improves long-term potentiation, and counteracts amyloid beta–induced pathology. *Neurobiol Aging*. 2019 Sep;81:88–101.
107. Cho B, Yoo SJ, Kim SY, Lee CH, Lee YI, Lee SR, et al. Second-generation non-hematopoietic erythropoietin-derived peptide for neuroprotection. *Redox Biol*. 2022 Feb;49:102223.
108. Yamashita T, Nonoguchi N, Ikemoto T, Miyatake SI, Kuroiwa T. Asialoerythropoietin attenuates neuronal cell death in the hippocampal CA1 region after transient forebrain ischemia in a gerbil model. *Neurol Res*. 2010 Nov;32(9):957–62.
109. Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, Xie Q wen, Coleman T, Kreilgaard M, et al. Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci*. 2003 May 27;100(11):6741–6.
110. Kittur FS, Hung CY, Li PA, Sane DC, Xie J. Asialo-rhuEPO as a Potential Neuroprotectant for Ischemic Stroke Treatment. *Pharmaceuticals*. 2023 Apr 18;16(4):610.
111. Bürgi M, Aparicio GI, Dorella A, Kratje R, Scorticati C, Oggero M. Novel erythropoietin-based therapeutic candidates with extra *N*-glycan sites that block hematopoiesis but preserve neuroplasticity. *Biotechnol J*. 2021 May;16(5).

112. Suen KF, Turner MS, Gao F, Liu B, Althage A, Slavin A, et al. Transient expression of an IL-23R extracellular domain Fc fusion protein in CHO vs. HEK cells results in improved plasma exposure. *Protein Expr Purif.* 2010 May;71(1):96–102.
113. Böhm E, Seyfried BK, Dockal M, Graninger M, Hasslacher M, Neurath M, et al. Differences in N-glycosylation of recombinant human coagulation factor VII derived from BHK, CHO, and HEK293 cells. *BMC Biotechnol.* 2015 Dec;15(1):87.
114. Wang M, Ishino T, Joyce A, Tam A, Duan W, Lin L, et al. Faster in vivo clearance of human embryonic kidney than Chinese hamster ovary cell derived protein: Role of glycan mediated clearance. *J Biosci Bioeng.* 2015 Jun;119(6):657–60.
115. Gugliotta A, Ceaglio N, Raud B, Forno G, Mauro L, Kratje R, et al. Glycosylation and antiproliferative activity of hyperglycosylated IFN- α 2 potentiate HEK293 cells as biofactories. *Eur J Pharm Biopharm.* 2017 Mar;112:119–31.
116. Wright HL, Evans C, Jackson PJ, James DC, Tee KL, Wong TS, et al. Glycoprofile Comparison of the SARS-CoV-2 Spike Proteins Expressed in CHO and HEK Cell Lines. *Mol Biotechnol.* 2024 Oct 1;
117. Chen Y, Dalwadi G, Benson HAE. Drug Delivery Across the Blood-Brain Barrier. *Current drug delivery.* 2004; 1(4):361-76.
118. Banks WA, Jumbe NL, Farrell CL, Niehoff ML, Heatherington AC. Passage of erythropoietic agents across the blood–brain barrier: a comparison of human and murine erythropoietin and the analog darbepoetin alfa. *Eur J Pharmacol.* 2004 Nov;505(1–3):93–101.
119. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, De Lanerolle NC, Cerami C, et al. Erythropoietin crosses the blood–brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci.* 2000 Sep 12;97(19):10526–31.
120. Dame C, Juul SE, Christensen RD. The Biology of Erythropoietin in the Central Nervous System and Its Neurotrophic and Neuroprotective Potential. *Neonatology.* 2001;79(3–4):228–35.
121. Brines M, Cerami A. Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 2005 Jun 1;6(6):484–94.
122. Juul SE, McPherson RJ, Farrell FX, Jolliffe L, Ness DJ, Gleason CA. Erythropoietin Concentrations in Cerebrospinal Fluid of Nonhuman Primates and Fetal Sheep following High-Dose Recombinant Erythropoietin. *Neonatology.* 2004;85(2):138–44.
123. Mikitsh JL, Chacko AM. Pathways for Small Molecule Delivery to the Central Nervous System across the Blood-Brain Barrier. *Perspect Med Chem.* 2014 Jan;6.

124. Amadeo I, Oggero M, Zenclussen ML, Robles L, Pereira D, Kratje R, et al. A single monoclonal antibody as probe to detect the entire set of native and partially unfolded rhEPO glycoforms. *J Immunol Methods*. 2004 Oct;293(1-2):191-205.
125. Formoso K, Billi SC, Frasca AC, Scorticati C. Tyrosine 251 at the C-terminus of neuronal glycoprotein M6a is critical for neurite outgrowth. *J Neurosci Res*. 2015 Feb;93(2):215-29.
126. Cook JA, Mitchell JB. Viability measurements in mammalian cell systems. *Anal Biochem*. 1989 May;179(1):1-7.
127. Hasegawa T. History and Evolution of Culture Maintenance and Preservation Techniques. In: *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry* [Internet]. Elsevier; 1996 [cited 2025 Oct 2]. p. 15-27. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012361946450003X>
128. Freshney R. Cryopreservation. En *Culture of animal cells. A manual of basic technique*. New Jersey, EEUU: Wiley-Liss Inc; 2000. Cap. 16, pp.297-308.
129. Freshney, R. Cloning and selection. En *Culture of animal cells. A manual of basic technique*. Wiley-Liss Inc.; 2000. Cap. 13, pp. 195-213.
130. Greene AE, Athreya B, Lehr HB, Coriell LL. Viability of Cell Cultures Following Extended Preservation in Liquid Nitrogen. *Exp Biol Med*. 1967 Apr 1;124(4):1302-7.
131. Hay RJ. Preservation and characterisation. En: *Animal cell culture. A practical approach*. (Ed.: Freshney, R.I.). Oxford, Inglaterra: IRL Press; 1986. p. 71-112.
132. Lovelock, J.E., Bishop, M.W.H. Prevention of freezing damage to living cells with dimethyl sulphoxide. *Nature*. 1959;183:1394-5.
133. Leibo, S.P., Mazur, P. The role of cooling rates in low-temperature preservation. *Cryobiology*. 1971;8(5):447-52.
134. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. Gel electrophoresis of DNA. En: *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. (Ed.: Nolan, C.). New York, EEUU: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989. Cap 6, pp. 61-62.
135. Sakuma T, Barry MA, Ikeda Y. Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem J*. 2012 May 1;443(3):603-18.
136. Wandel Petersen V. Tesina de Licenciatura en Biotecnología: Optimización de un enzimoimmunoensayo para la evaluación farmacocinética de variantes hiperglicosiladas de eritropoyetina humana (hEPO). Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL. Santa Fe, Argentina. 2021.

137. Rochefort NL, Konnerth A. Dendritic spines: from structure to *in vivo* function. *EMBO Rep.* 2012 Aug;13(8):699–708.
138. Ippolito DM, Eroglu C. Quantifying Synapses: an Immunocytochemistry-based Assay to Quantify Synapse Number. *J Vis Exp.* 2010 Nov 16;(45).
139. Shargel L, Wu Pong S. Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics. In: Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics. Mc Graw Hill; p. 75–96.
140. Zaqout S, Kaindl AM. Golgi-Cox Staining Step by Step. *Front Neuroanat.* 2016 Mar 31;10.
141. Meijering E, Jacob M, Sarria J -C. F, Steiner P, Hirling H, Unser M. Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images. *Cytometry A.* 2004 Apr;58A(2):167–76.
142. Kitamura T, Tange T, Terasawa T, Chiba S, Kuwaki T, Miyagawa K, et al. Establishment and characterization of a unique human cell line that proliferates dependently on GM-CSF, IL-3, or erythropoietin. *J Cell Physiol.* 1989 Aug;140(2):323–34.
143. Croset A, Delafosse L, Gaudry JP, Arod C, Glez L, Losberger C, et al. Differences in the glycosylation of recombinant proteins expressed in HEK and CHO cells. *J Biotechnol.* 2012 Oct;161(3):336–48.
144. Ferrari A. Tesina de Licenciatura en Biotecnología: Evaluación de distintas variantes de una citoquina que afectan su proceso de producción, purificación y/o caracterización fisicoquímica y biológica. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL, Argentina. 2017;
145. Noguchi A, Mukuria CJ, Suzuki E, Naiki M. Immunogenicity of iV-Glycolylneuraminic Acid-Containing Carbohydrate Chains of Recombinant Human Erythropoietin Expressed in Chinese Hamster Ovary Cells. *J Biochem.* 1995 Jan;117(1):59-62
146. Wang Q, Wang Y, Yang S, Lin C, Aliyu L, Chen Y, et al. A Linkage-specific Sialic Acid Labeling Strategy Reveals Different Site-specific Glycosylation Patterns in SARS-CoV-2 Spike Protein Produced in CHO and HEK Cell Substrates. *Front Chem.* 2021 Sep 24;9:735558.
147. Yehuda S, Padler-Karavani V. Glycosylated Biotherapeutics: Immunological Effects of N-Glycolylneuraminic Acid. *Front Immunol.* 2020 Jan 23;11:21.
148. Okerblom J, Varki A. Biochemical, Cellular, Physiological, and Pathological Consequences of Human Loss of N -Glycolylneuraminic Acid. *ChemBioChem.* 2017 Jul 4;18(13):1155–71.

149. Jiang J, Tian F, Cai Y, Qian X, Costello CE, Ying W. Site-specific qualitative and quantitative analysis of the N- and O-glycoforms in recombinant human erythropoietin. *Anal Bioanal Chem.* 2014 Oct;406(25):6265–74.
150. Nasser TI, Spencer GE. Neurite Outgrowth. In: Reference Module in Biomedical Sciences. Elsevier; 2017. p. B9780128012383995072.
151. Zhong Y, Yao H, Deng L, Cheng Y, Zhou X. Promotion of neurite outgrowth and protective effect of erythropoietin on the retinal neurons of rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2007 Nov 16;245(12):1859–67.
152. Bocker-Meffert S, Rosenstiel P, Rohl C, Warneke N, Held-Feindt J, Sievers J, et al. Erythropoietin and VEGF Promote Neural Outgrowth from Retinal Explants in Postnatal Rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002 Jun;43(6):2021-6
153. Wit CB, Hiesinger PR. Neuronal filopodia: From stochastic dynamics to robustness of brain morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2023 Jan; 133:10–9.
154. Dias RB, Rodrigues TM, Rombo DM, Ribeiro FF, Rodrigues J, McGarvey J, et al. Erythropoietin Induces Homeostatic Plasticity at Hippocampal Synapses. *Cereb Cortex.* 2018 Aug 1;28(8):2795–809.
155. Adamcio B, Sargin D, Stradomska A, Medrihan L, Gertler C, Theis F, et al. Erythropoietin enhances hippocampal long-term potentiation and memory. *BMC Biol.* 2008 Dec;6(1).
156. Krediet RT, Barreto DL, Van Diepen AT. Assessment of the size selectivity of peritoneal permeability by the restriction coefficient to protein transport. *Perit Dial Int J Int Soc Perit Dial.* 2022 Jul;42(4):335–43.
157. Mahmood I, Green MD. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Considerations in the Development of Therapeutic Proteins. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44(4):331–47.
158. Jenkins N, Curling EMA. Glycosylation of recombinant proteins: Problems and prospects. *Enzyme Microb Technol.* 1994 May;16(5):354–64.
159. Almaguer-Melian W, Mercerón-Martínez D, Delgado-Ocaña S, Pavón-Fuentes N, Ledón N, Bergado JA. EPO induces changes in synaptic transmission and plasticity in the dentate gyrus of rats. *Synapse.* 2016 Jun;70(6):240–52.
160. Oh DH, Lee IY, Choi M, Kim SH, Son H. Comparison of Neurite Outgrowth Induced by Erythropoietin (EPO) and Carbamylated Erythropoietin (CEPO) in Hippocampal Neural Progenitor Cells. *Korean J Physiol Pharmacol.* 2012;16(4):281.
161. Hassouna I, Ott C, Wüstefeld L, Offen N, Neher RA, Mitkovski M, et al. Revisiting adult neurogenesis and the role of erythropoietin for neuronal and oligodendroglial differentiation in the hippocampus. *Mol Psychiatry.* 2016 Dec;21(12):1752–67.

162. Wakhloo D, Scharkowski F, Curto Y, Javed Butt U, Bansal V, Steixner-Kumar AA, et al. Functional hypoxia drives neuroplasticity and neurogenesis via brain erythropoietin. *Nat Commun.* 2020 Mar 9;11(1).
163. Jacobs RA, Aboouf MA, Koester-Hegmann C, Muttathukunnel P, Laouafa S, Arias-Reyes C, et al. Erythropoietin promotes hippocampal mitochondrial function and enhances cognition in mice. *Commun Biol.* 2021 Aug 5;4(1).
164. Ehrenreich H, Hinze-Selch D, Stawicki S, Aust C, Knolle-Veentjer S, Wilms S, et al. Improvement of cognitive functions in chronic schizophrenic patients by recombinant human erythropoietin. *Mol Psychiatry.* 2007 Feb 1;12(2):206–20.
165. Garcia MD, Formoso K, Aparicio GI, Frasch ACC, Scorticati C. The Membrane Glycoprotein M6a Endocytic/Recycling Pathway Involves Clathrin-Mediated Endocytosis and Affects Neuronal Synapses. *Front Mol Neurosci.* 2017 Sep 20;10.
166. Miskowiak K, O'Sullivan U, Harmer CJ. Erythropoietin Enhances Hippocampal Response during Memory Retrieval in Humans. *J Neurosci.* 2007 Mar 14;27(11):2788–92.
167. Newton SS, Sathyanesan M. Erythropoietin and Non-Erythropoietic Derivatives in Cognition. *Front Pharmacol.* 2021 Sep 6;12.