

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



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

“Diseño y optimización de un proceso de producción de muteínas de interferón- α 2b humano con mayor actividad biológica mediante glicosilación en células de mamífero”

Agustina Gugliotta

Director de tesis: Dr. Marcos Oggero
Co-director de Tesis: Dra. Natalia Ceaglio

Lugar de realización:
Laboratorio de Cultivos Celulares
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas
Universidad Nacional del Litoral

-2016-

PUBLICACIONES:

“Differences in the production of hyperglycosylated IFN alpha in CHO and HEK 293 cells” Agustina Gugliotta, Marcos Oggero Eberhardt, Marina Etcheverrigaray, Ricardo Kratje, Natalia Ceaglio. En BMC Proceedings 2013, 7 (Suppl 6): P33; y electrónico en <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1753-6561-7-S6-P33>.

“Glycosylation and antiproliferative activity of hyperglycosylated IFN- α 2 potentiate HEK293 cells as biofactories” Agustina Gugliotta, Natalia Ceaglio, Brenda Raud, Guillermina Forno, Laura Mauro, Ricardo Kratje, Marcos Oggero. Eur J Pharm Biopharm. 2016 Nov 17. doi: 10.1016/j.ejpb.2016.11.012 (en prensa).

PRESENTACIONES

XIII Encuentro de Jóvenes Investigadores de la Universidad Nacional del Litoral y IV Encuentro de Jóvenes Investigadores de Universidades de Santa Fe. Santa Fe, 19 y 20 de Noviembre de 2009. Nuevas estrategias para la obtención de moléculas hiperglicosiladas de interferón alfa. Agustina Gugliotta, Natalia Ceaglio, Marcos Oggero, Marina Etcheverrigaray y Ricardo Kratje.

XVIII Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Asociación de Universidades Grupo Montevideo (AUGM). Santa Fe, 19, 20 y 21 de Octubre de 2010. Desarrollo y caracterización de nuevas variantes hiperglicosiladas de interferón alfa. Agustina Gugliotta, Marina Etcheverrigaray, Ricardo Kratje y Natalia Ceaglio.

XIV Encuentro de Jóvenes Investigadores de la UNL y V encuentro de Jóvenes Investigadores de Universidades de Santa Fe. Santa Fe, 3 y 4 de Noviembre de 2010. Construcción de nuevas variantes de IFN- α 2b con un mayor grado de glicosilación y actividad biológica antiproliferativa *in vitro*. Agustina Gugliotta, Natalia Ceaglio, Marcos Oggero, Marina Etcheverrigaray y Ricardo Kratje.

IV Seminario Latinoamericano de Tecnología de Cultivos de Células (SLATCC). Montevideo, Uruguay. 7, 8 y 9 de Noviembre de 2010. Nuevas estrategias para la glicosilación de moléculas de rhIFN- α 2b en cultivos celulares. Agustina Gugliotta, Natalia Ceaglio, Marcos Oggero, Marina Etcheverrigaray y Ricardo Kratje.

I Simposio Argentino de los Procesos Biotecnológicos (SAProBio). Rosario, 25 de Noviembre de 2010. Producción, Purificación y Caracterización de Moléculas hiperglicosiladas de rhIFN- α 2b. Agustina Gugliotta, Natalia Ceaglio, Marina Etcheverrigaray y Ricardo Kratje.

XLVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Potrero de los Funes, San Luis, Argentina. 30 y 31 de octubre, 1 y 2 de noviembre de 2011. High IFN- α 2b productivity obtained from lentivirus-transduced CHO cells. Agustina Gugliotta, Natalia Ceaglio, Claudio Prieto, Marina Etcheverrigaray, Ricardo Kratje, Marcos Oggero.

II Simposio Argentino de los Procesos Biotecnológicos (SAProBio). La Plata, 10 y 11 de Mayo de 2012. Empleo de vectores lentivirales para la generación de líneas y clones de células CHO.K1 con elevada productividad de rhIFN- α 2b hiperglicosilado. Agustina Gugliotta, Natalia Ceaglio, Claudio Prieto, Marina Etcheverrigaray, Ricardo Kratje y Marcos Oggero Eberhardt.

V Seminario Latinoamericano de Tecnología de Cultivos de Células (SLATCC). Santa Fe, Argentina. 25, 26 y 27 de Octubre de 2012. CHO vs. HEK en la producción de IFN hiperglicosilado. Agustina Gugliotta, Natalia Ceaglio, Claudio Prieto, Marcos Oggero, Marina Etcheverrigaray y Ricardo Kratje.

Muestra de Producción Científico Académica en el marco de los 40 años de la FCB. Santa Fe, Argentina. 1 de Noviembre de 2012. CHO vs. HEK en la producción de IFN hiperglicosilado. Agustina Gugliotta, Natalia Ceaglio, Claudio Prieto, Marcos Oggero, Marina Etcheverrigaray y Ricardo Kratje.

XXIII European Society for Animal Cell Technology (ESACT) Meeting on Cell Based Technologies. Lille, Francia. 23 al 26 de Junio de 2013. Differences in the production of

hyperglycosylated IFN alpha in CHO and HEK 293 cells. Agustina Gugliotta, Marcos Oggero Eberhardt, Marina Etcheverrigaray, Ricardo Kratje, Natalia Ceaglio.

XVIII Encuentro de Jóvenes Investigadores de la UNL. Santa Fe, 3 y 4 de Septiembre de 2014. Impacto del sistema de expresión sobre las propiedades de una variante hiperglicosilada de IFN- α . Brenda Raud, Agustina Gugliotta, Natalia Ceaglio y Marcos Oggero.

VI Seminario Latinoamericano de Tecnología de Cultivos de Células (SLATCC). Valparaíso, Chile. 6, 7 y 8 de Noviembre de 2014. Caracterización de una nueva variante de IFN- α 2b producida en diferentes líneas celulares. Agustina Gugliotta, Brenda Raud, Marcos Oggero, Marina Etcheverrigaray, Ricardo Kratje, Natalia Ceaglio.

VI Seminario Latinoamericano de Tecnología de Cultivos de Células (SLATCC). Valparaíso, Chile. 6, 7 y 8 de Noviembre de 2014. Diseño y caracterización de nuevas muteínas de IFN- α 2b con propiedades mejoradas respecto al IFN4N. Agustina Gugliotta, Natalia Ceaglio, Marina Etcheverrigaray, Ricardo Kratje, Marcos Oggero.

III Simposio Argentino de los Procesos Biotecnológicos (SAProBio). Santa Fe, 9 y 10 de Diciembre de 2014. Empleo de diferentes líneas celulares como sistemas de producción de una muteína hiperglicosilada de IFN- α 2b. Agustina Gugliotta, Brenda Raud, Marcos Oggero, Marina Etcheverrigaray, Ricardo Kratje, Natalia Ceaglio.

XXIV Meeting of the European Society for Animal Cell Technology (ESACT). Barcelona. España, 31 Mayo al 3 Junio, 2015. Hyperglycosylated interferon-alpha produced in CHO-K1 and HEK293 cells: differences in glycan structure, biological activity and pharmacokinetics. Agustina Gugliotta, Brenda Raud, Marcos Oggero, Marina Etcheverrigaray, Ricardo Kratje, Natalia Ceaglio.

LX Reunión de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS). Mar del Plata, 18 al 21 de Noviembre de 2015. Producción de un nuevo agente terapéutico basado en la hiperglicosilación de hIFN- α 2b empleando huéspedes celulares derivados de mamíferos. Agustina Gugliotta, Brenda Raud, Marcos Oggero Eberhardt, Marina Etcheverrigaray, Ricardo Kratje, Natalia Ceaglio.

II Simposio Argentino de Glicobiología. GlycoAr 2016 (2nd Argentinian Symposium of Glycobiology). Villa General Belgrano, Córdoba, Argentina. 1 al 3 de Junio de 2016. HEK293 cell line: a promising host for the production of a hyperglycosylated hIFN- α 2b. Agustina Gugliotta, Natalia Ceaglio, Brenda Raud, Guillermina Forno, Laura Mauro, Marina Etcheverrigaray, Ricardo Kratje, Marcos Oggero Eberhardt.

VII Seminario Latinoamericano de Tecnología de Cultivos de Células (SLATCC). Hacienda de Cocoyoc, Cocoyoc, Morelos. México. 3, 4 y 5 de Noviembre de 2016. La actividad antitumoral de una proteína terapéutica hiperglicosilada derivada del hIFN- α 2b potencia su producción en células HEK293. Agustina Gugliotta, Natalia Ceaglio, Brenda Raud, Laura Mauro, Guillermina Forno, Ricardo Kratje, Marcos Oggero.

ÍNDICE

Abreviaturas, siglas y símbolos	vii
Unidades	xiii
Resumen	xiv
Summary	xvii
Introducción	1
1. Expresión de proteínas recombinantes terapéuticas en células eucariotas	1
1.1 Líneas celulares empleadas para la producción de proteínas recombinantes	1
1.2 Tecnologías empleadas para el desarrollo de líneas celulares productoras de proteínas recombinantes	5
1.2.1 Expresión transitoria de proteínas recombinantes	7
1.2.2 Expresión estable de proteínas recombinantes	7
1.2.2.1 Sistemas para la amplificación de la expresión del gen de interés	8
1.2.2.2 Ingeniería de genomas: modificaciones sitio dirigidas	9
1.2.2.3 Transferencia de genes mediante el empleo de vectores lentivirales	9
2. Interferón	12
2.1 Un poco de historia	12
2.2 La familia IFN	12
2.3 El sistema IFN	13
2.4 IFN-I	15
2.5 Receptores de IFN-I. Mecanismo de transducción de señales	15
2.6 Actividad biológica de los IFN-I	17
2.6.1 Actividad biológica antiviral	17
2.6.2 Actividad biológica antiproliferativa	19
2.6.3 Actividad biológica inmunomoduladora	19
2.7 IFN- α humano	20
2.7.1 Estructura del IFN- α	21
2.7.2 Interacción entre el IFN- α y el receptor para IFN-I (IFNAR)	22
2.8 Sistemas de expresión para la producción del hIFN- α 2 recombinante	24
2.9 Usos clínicos del rhIFN- α 2	25
2.10 Propiedades farmacocinéticas y efectos adversos del rhIFN- α 2	27
3. Glicosilación	27
3.1 Glicosilación tipo N	28
3.2 Glicosilación tipo O	31
3.3 Factores externos que influyen la glicosilación de proteínas	32
3.3.1 Tipo celular y factores específicos de especie	32
3.3.2 Factores ambientales y condiciones de cultivo	32

3.4	Impacto de la glicosilación sobre las propiedades farmacológicas de proteínas terapéuticas	34
3.4.1	Integridad	34
3.4.2	Farmacocinética y Farmacodinamia	34
3.4.3	Unión al receptor y actividad biológica	35
3.4.4	Inmunogenicidad	35
4.	Ingeniería de proteínas	36
4.1	Tecnologías aplicadas al mejoramiento de la farmacocinética y farmacodinamia de proteínas terapéuticas	37
4.1.1	Proteínas de fusión	37
4.1.2	Conjugación a polímeros	39
4.1.3	Glicoingeniería	40
	Objetivos	43
	Materiales y Métodos	45
1.	Reactivos y soluciones	45
2.	Líneas celulares, cepas bacterianas y cepas virales	45
3.	Medios de cultivo	46
3.1	Medios de cultivo para células eucariotas	46
3.2	Medios de cultivo para células procariontas	47
4.	Técnicas de Biología Molecular	48
4.1	Digestiones enzimáticas	48
4.2	Electroforesis en geles de agarosa	48
4.3	Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa	49
4.4	Purificación de fragmentos de ADN a partir de una mezcla de digestión	49
4.5	Reacciones de ligación de ADN	49
4.6	Preparación de células competentes	49
4.7	Transformación de células competentes	50
4.8	Preparación de ADN plasmídico	50
4.8.1	Minipreparación	50
4.8.2	Maxipreparación	51
4.9	Determinación de la concentración y pureza de ADN	52
4.10	Obtención de los vectores necesarios para la expresión de los genes de las variantes mutadas del hIFN- α 2b en células de mamífero	53
4.10.1	Mutagénesis sitio-dirigida e inserción de la secuencia codificante para el péptido ANITVNITV en el hIFN- α 2b	53
4.10.2	Clonado de los genes de las muteínas del hIFN- α 2b en el vector de expresión pCI-neo	60
4.10.3	Clonado de los genes de las muteínas del hIFN- α 2b en el vector de expresión pLV-PLK	61
4.11	Criopreservación de cepas bacterianas	63
4.12	Revitalización de cepas bacterianas	63
5.	Técnicas de cultivos celulares	63
5.1	Condiciones de cultivo de células de mamífero	63

5.2	Determinación de la concentración de células viables, muertas y totales	64
5.3	Transfecciones de células eucariotas	64
5.3.1	Transfección de células CHO para la expresión de las variantes glicosiladas del hIFN- α 2b	65
5.3.2	Transfección de células HEK para el ensamblado de partículas lentivirales	66
5.4	Transducción de células eucariotas	67
5.5	Presión de selección con antibiótico de las líneas celulares generadas mediante transducción	69
5.6	Clonado de las líneas celulares productoras de las muteínas del hIFN- α 2b	69
5.7	Determinación de la productividad celular	70
5.8	Evaluación del crecimiento y producción de las diferentes variantes del hIFN- α 2b por parte de los clones celulares seleccionados	71
5.8.1	Monitoreo del consumo de glucosa y de la producción de lactato, amonio y hIFN- α 2b en sobrenadantes de cultivo	71
5.8.2	Estimación de parámetros cinéticos de cultivo. Determinación de la integral de células viables (ICV), de la velocidad específica de crecimiento celular y de las velocidades específicas de consumo y producción de metabolitos	72
5.9	Criopreservación de líneas y clones celulares de mamíferos	73
5.10	Revitalización de líneas celulares de mamífero	74
5.11	Producción de las variantes glicosiladas del hIFN- α 2b mediante el cultivo de clones en condiciones de adherencia	74
6.	Purificación de las variantes glicosiladas del hIFN- α 2b a partir de sobrenadantes de cultivo por cromatografía de inmunoafinidad	75
6.1	Material de partida	75
6.2	Equipamiento	75
6.3	Preparación de las matrices de inmunoafinidad	76
6.3.1	Amplificación de hibridomas productores de mAbs anti-hIFN- α 2b. Producción <i>in vivo</i> de líquido ascítico	76
6.3.2	Cuantificación de Igs totales	77
6.3.3	Purificación del mAb CA5E6	78
6.3.4	Inmovilización del mAb CA5E6	79
6.4	Protocolo de purificación empleando la resina CA5E6-Sepharose	80
6.5	Concentración y diafiltración de la proteína	81
7.	Caracterización fisicoquímica de las muteínas del hIFN- α 2b	81
7.1	Obtención de los reactivos necesarios para el desarrollo de los distintos enzimoimmunoensayos (ELISA) necesarios para la cuantificación de las muteínas	81
7.2	Cuantificación de las muteínas del hIFN- α 2b mediante ELISA	82
7.2.1	ELISA sándwich	82
7.2.2	ELISA de competición	83
7.3	Identificación y análisis de glicofomas de las nuevas variantes glicosiladas del hIFN- α 2b	84
7.3.1	Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	84

7.3.1.1	Detección mediante coloración con azul brillante de <i>Coomasie</i>	85
7.3.1.2	Detección inmunoquímica (<i>western blot</i>)	85
7.3.2	Isoelectroenfoque	86
7.3.2.1	Detección mediante coloración con azul brillante de <i>Coomasie</i> coloidal	86
7.3.2.2	Detección inmunoquímica (<i>western blot</i>)	87
8.	Caracterización biológica <i>in vitro</i> de las muteínas del hIFN- α 2b	87
8.1	Valoración de la actividad biológica antiviral	87
8.2	Valoración de la actividad biológica antiproliferativa	89
8.3	Análisis de la actividad biológica antiproliferativa <i>in vitro</i> de las variantes del hIFN- α 2b en líneas celulares derivadas de tumores sólidos	90
9.	Análisis de la glicosilación de las variantes del hIFN- α 2b	91
9.1	Cuantificación de ácido siálico	91
9.2	Cuantificación de monosacáridos	92
9.3	N-deglicosilación enzimática	93
9.4	Marcación de los N-glicanos con el fluoróforo 2-AB	93
9.5	Cromatografía de intercambio aniónico débil (WAX) de los glicanos marcados	94
9.6	Digestión de N-glicanos marcados con exoglicosidasas y análisis mediante cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC-HPLC)	94
9.7	Cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC-UPLC) y espectrometría de masas de N-glicanos marcados con 2-AB	95
10.	Evaluación de la estabilidad térmica del IFN4N derivado de células CHO y HEK	96
11.	Evaluación de la farmacocinética de las variantes del hIFN- α 2b en animales de experimentación utilizando la vía subcutánea	96
11.1	Metodología experimental	96
11.2	Estimación de los parámetros farmacocinéticos mediante el método de los residuales	99
12.	Estudio de la actividad biológica antitumoral <i>in vivo</i> de diferentes muteínas del hIFN- α 2b en animales de experimentación	100
	Resultados y Discusión	103
1.	Optimización de la etapa de <i>upstream</i> del proceso de producción del IFN4N	104
1.1	Obtención de los vectores de expresión conteniendo el gen del IFN4N	104
1.2	Generación de líneas celulares productoras de IFN4N	106
1.3	Clonado de las líneas celulares productoras de IFN4N	108
1.4	Caracterización de los clones de células CHO y HEK productores de IFN4N. Elección del clon apropiado para el proceso de producción	110
1.4.1	Análisis de las características de crecimiento, consumo de nutrientes, producción de metabolitos y de la proteína de interés por parte de los clones seleccionados	110
1.4.2	Caracterización del IFN4N producido por cada uno de los clones obtenidos a partir de CHO Td IFN4N (350) y HEK Td IFN4N (200)	114
1.4.2.1	Análisis del grado de glicosilación del IFN4N producido	

	por los clones derivados de células CHO y HEK	114
1.4.2.2	Evaluación de la ABE antiviral y antiproliferativa <i>in vitro</i> del IFN4N producido por los clones derivados de células CHO y HEK	117
1.5	Producción de IFN4N _{CHO} e IFN4N _{HEK} en condiciones de adherencia	120
1.6	Producción y purificación del mAb anti-hIFN- α 2b CA5E6 para su empleo en ensayos de ELISA sándwich, ELISA de competición y cromatografía de inmunoafinidad	120
1.6.1	Producción <i>in vivo</i> del mAb CA5E6 mediante la obtención de líquido ascítico	120
1.6.2	Purificación del mAb CA5E6 por cromatografía de afinidad a proteína A	121
1.7	Purificación de IFN4N _{CHO} e IFN4N _{HEK} mediante cromatografía de inmunoafinidad	123
1.7.1	Inmovilización del mAb CA5E6 a una resina de <i>Sepharose</i> [™] activada con CNBr. Cálculo de la capacidad teórica y dinámica de la matriz	124
1.7.2	Purificación de IFN4N producido por los clones de células CHO-K1 y HEK293	125
1.8	Caracterización de las moléculas IFN4N _{CHO} e IFN4N _{HEK} purificadas	128
1.8.1	Caracterización fisicoquímica	128
1.8.2	Análisis glicosídico del IFN4N _{CHO} e IFN4N _{HEK}	131
1.8.2.1	Determinación del contenido de ácido siálico presente en el IFN4N _{HEK} e IFN4N _{CHO}	131
1.8.2.2	Análisis de la composición de monosacáridos característica de los glúcidos del IFN4N derivado de células CHO y HEK	132
1.8.2.3	Comparación de glicanos neutros y cargados presentes en el IFN4N _{HEK} e IFN4N _{CHO}	133
1.8.2.4	Análisis de N-glicanos provenientes del IFN4N _{HEK} e IFN4N _{CHO} mediante cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC) y espectrometría de masas. Análisis de las muestras luego de la digestión con enzimas exoglicosidasas	136
1.8.3	Caracterización biológica <i>in vitro</i> del IFN4N _{CHO} e IFN4N _{HEK}	140
1.8.4	Evaluación de la estabilidad del IFN4N _{CHO} e IFN4N _{HEK} a elevadas temperaturas	142
1.8.5	Evaluación farmacocinética del IFN4N _{CHO} e IFN4N _{HEK}	143
1.8.6	Análisis de la actividad biológica <i>in vivo</i> del IFN4N _{CHO} e IFN4N _{HEK}	145
2.	Obtención de nuevas variantes del hIFN- α 2b con características mejoradas respecto del IFN4N	149
2.1	Construcción de muteínas del hIFN- α 2b con un número variable de sitios para N-glicosilación	151
2.1.1	Mutagénesis sitio dirigida del hIFN- α 2b, IFN2N, IFN3N e IFN4N	151
2.1.2	Clonado de los genes de las nuevas muteínas del hIFN- α 2b en el	

	vector de expresión pCI-neo	153
2.2	Transfecciones transitorias de células CHO-K1, empleando los vectores de expresión pCI-neo	155
2.3	Caracterización de las nuevas muteínas de hIFN- α 2b a partir de sobrenadantes de cultivo provenientes de las transfecciones transitorias	155
2.3.1	Cuantificación de las nuevas muteínas	155
2.3.2	Evaluación del grado de glicosilación de las nuevas muteínas mediante SDS-PAGE e isoelectroenfoque seguidos de <i>western blot</i>	157
2.3.3	Determinación de la AB <i>in vitro</i> de las nuevas muteínas a partir de muestras del ensayo de transfección transitoria	159
2.4	Generación de líneas celulares productoras de IFN3NM47, IFN2NM47/95, IFN4NM47, IFN4NMutNter, IFN3NM47/95 e IFN3N47MutNter mediante el empleo de la tecnología de vectores lentivirales de tercera generación	161
2.4.1	Obtención de plásmidos apropiados para el ensamblaje de partículas lentivirales, conteniendo las secuencias de interés	161
2.4.2	Ensamblado de partículas lentivirales y transducción de células CHO. Caracterización de las líneas celulares resultantes	162
2.5	Clonado de las líneas celulares CHO productoras de IFN2NM47/95, IFN3NM47, IFN4NM47, IFN4NMutNter, IFN3NM47/95 e IFM3N47MutNter. Caracterización y elección de los clones productores	165
2.6	Producción de IFNwtMutNter, IFN2NM47/95, IFN3NM47, IFN4NM47, IFN4NMutNter, IFN3NM47/95 e IFN3N47MutNter mediante el cultivo de los clones seleccionados en condiciones de adherencia	170
2.7	Purificación de IFNwtMutNter, IFN2NM47/95, IFN3NM47, IFN4NM47, FN4NMutNter, IFN3NM47/95 e IFN3N47MutNter mediante cromatografía de inmunoafinidad	172
2.8	Caracterización fisicoquímica de las variantes glicosiladas del hIFN- α 2b	174
2.9	Análisis del contenido de ácido siálico, contenido de glicanos neutros y cargados de las muteínas glicosiladas del hIFN- α 2b	177
2.10	Caracterización biológica <i>in vitro</i> de las variantes glicosiladas del hIFN- α 2b	180
2.11	Análisis de las propiedades farmacocinéticas de las variantes glicosiladas del hIFN- α 2b	182
2.12	Análisis de la actividad biológica <i>in vivo</i> del IFN3NM47, IFN4NM47 e IFN3N47MutNter	186
	Conclusiones	191
	Anexo	198
	Bibliografía	200

ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS

2'5'A	oligonucleótidos de adenosina unidos por enlace fosfodiéster en una conformación inusual 2'-5'
A	absorbancia
A375	línea celular humana establecida a partir de melanoma maligno
ABAC	Asociación Banco Argentino de Células
AB	actividad biológica
ABE	actividad biológica específica
ABS	<i>Arthrobacter ureafaciens</i> sialidasa
ACHN	línea celular humana establecida a partir de adenocarcinoma renal
ACN	acetonitrilo
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico copia
ADNdc	ADN doble cadena
Amp ^R	resistencia a ampicilina
ANOVA	análisis de la varianza
ARN	ácido ribonucleico
ARNasa	endorribonucleasa
ARNdc	ácido ribonucleico doble copia
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ARNsc	ARN simple cadena
AS	ácido siálico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AUC	área bajo la curva
Bcl-2	gen antiapoptótico
bFGF	factor de crecimiento fibroblástico básico
BHK	línea celular de hámster bebé establecida a partir de riñón
BKF	α -L-fucosidasa de riñón bovino
BSA	seroalbúmina bovina
BTG	β -galactosidasa de testículo bovino
Cél.	células
C	concentración de IFN
C ₀	concentración de IFN en la muestra sembrada
CHO	línea celular de hámster chino establecida a partir de ovario
CIA	cromatografía de inmunoafinidad
C _i	concentración inicial de células sembradas
C _f	concentración final de células luego de la incubación
C _{IFN}	concentración de IFN
CL	<i>clearance</i>
CL _{app}	<i>clearance</i> aparente
C _{máx}	concentración plasmática máxima de la droga luego de su administración
CMH	complejo mayor de histocompatibilidad
CMV	citomegalovirus
CO ₂	dióxido de carbono

col.	colaboradores
C_p	concentración de la droga en plasma
C_p^t	concentración de la droga en plasma a tiempos tardíos
C_p^0	concentración inicial de la droga en plasma
csp	cantidad suficiente para
CSF-1	factor estimulante de colonias de tipo 1
CTP	<i>carboxy-terminal peptide</i>
D_B	cantidad de droga en el cuerpo
DHFR	dihidrofolato reductasa
D_{GI}	cantidad de droga en el tracto gastrointestinal
D-MEM	medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	dimetilsulfóxido
dNTPs	desoxinucleótidos
Dol-P	lípidico dolicol fosfato
DSMZ	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH</i>
D_0	dosis de droga administrada
E	coeficiente de extinción
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético
eIF2	factor de iniciación de la transcripción
ELISA	enzimoinmunoensayo
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EPO	eritropoyetina
ESAs	<i>erythropoiesis-stimulating agents</i>
ES-PCR	extensión por solapamiento mediante PCR
F	fracción de fármaco absorbida
Fc	fragmento constante de las inmunoglobulinas
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fig.	figura
FIX	factor IX de la cascada de coagulación sanguínea
FSH	hormona folículo-estimulante
FT	<i>flowthrough</i>
Fuc	fucosa
FVIIa	factor VIIa de la cascada de coagulación sanguínea
FVIII	factor VIII de la cascada de coagulación sanguínea
Fw	en sentido directo
gag	proteína de la cápside lentiviral
Gal	galactosa
GalNAc	N-acetilgalactosamina
Glc	glucosa
GlcNAc	N-acetilglucosamina
GH	hormona de crecimiento
GTPasa	enzima fosforilasa que hidroliza GTP
GM-CSF	factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

GS	glutamina sintetasa
Ham's F12	fórmula 12 de Ham
HBV	virus de la hepatitis B
hCG	gonadotropina coriónica humana
HCV	virus de la hepatitis C
HEPA	filtro para partículas de aire de alta eficiencia
HEK293	línea celular humana establecida a partir de riñón
hIFN	interferón humano
HILIC	cromatografía líquida de interacción hidrofílica
HIV	virus de la inmunodeficiencia humana
HMP	estructuras de alta manosas fosforiladas
HPAEC-PAD	cromatografía de intercambio aniónico de alta <i>performance</i> con detección de pulso amperométrico
HPLC	cromatografía líquida de alta <i>performance</i>
hTPO	trombopoyetina humana
hTSH	tirotropina humana
ICV	integral de células viables
IEF	isoelectroenfoque
IFN	interferón
IFN-I	interferón tipo I
IFNAR	receptores de interferón
IFNAR-1	receptor de interferón- subunidad 1
IFNAR-2	receptor de interferón- subunidad 2
Ig	inmunoglobulina
IL	interleuquina
IN	integrasa
IRFs	<i>interferon regulatory factors</i>
ISGs	<i>IFN-stimulated genes</i>
ISGF3	<i>interferon-stimulated gene factor 3</i>
ISRE	<i>IFN stimulated response element</i>
JAK-1	<i>Janus kinase-1</i>
JBH	N-acetilhexosaminidasa de poroto de soja
k_a	constante de velocidad de absorción de primer orden
k_e	constante de eliminación de primer orden
LacNAc	extensiones lactosamina
LB	medio de cultivo Luria-Bertani
LCC	Laboratorio de Cultivos Celulares
LTRs	<i>long terminal repeats</i>
LV	lentivirus
λ	longitud de onda
Neu5Ac	ácido acetilneuramínico
Neu5Gc	ácido glicolilneuramínico
M6P	manosa-6-fosfato
mAb	anticuerpo monoclonal
Man	manosa

MDBK	línea de células bovinas <i>Madin-Darbin</i> derivada de riñón
MEM	medio esencial mínimo
MM	masa molecular
MMP-9	metaloproteinasa de matriz-9
Mpl	factor de crecimiento y desarrollo de megacariocitos
MS	monosacárido
MSX	metionina sulfoximina
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxi-fenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolium)
MTX	metotrexato
Mx	proteína de resistencia a <i>myxovirus</i>
m/z	relación masa/carga
n/d	no detectable
ND	no determinado
N ₂	nitrógeno
Neo ^R	resistencia a neomicina
NESP	<i>novel erythropoiesis stimulating protein</i>
NF-κB	Factor de transcripción nuclear κB
NIBSC	<i>National Institute for Biological Standards and Control</i>
NK	células <i>natural killer</i>
NS0	línea de células murinas derivadas de mieloma
OAS	<i>2'-5'-oligoadenylate synthetase</i>
OPD	o-fenilendiamina
ORI	origen de replicación bacteriano
OST	oligosacariltransferasa
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
pb	pares de bases
PBS	solución salina de fosfatos
PC-3	línea celular humana establecida a partir de un adenocarcinoma de próstata
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEG	polietilenglicol
PEI	polietilenimina
pI	punto isoeléctrico
PKR	<i>protein kinase R</i>
PMS	metasulfato de fenazina
PNGAsa F	péptido-N4-(N-acetil-β-glucosaminil)asparagina amidasa
pol	proteína polimerasa lentiviral
PVDF	difluoruro de polivinilo
q _p	velocidad específica de consumo o producción de metabolitos
R	recuperación
RCLs	<i>replication-competent lentivirus</i>
RE	retículo endoplasmático
Rev	proteína lentiviral Rev

rFIXFc	proteína recombinante resultante de la fusión del FIX a la porción Fc de una IgG ₁
rFVIIIc	proteína recombinante resultante de la fusión del FVIII a la porción Fc de una IgG ₁
rhIFN	interferón recombinante humano
RMCE	<i>recombinase mediated cassette exchange</i>
RRE	<i>Rev response element</i>
Rv	en sentido reverso
RSV	virus del sarcoma de Rous
sc	subcutánea
SD	desviación estándar
SDS	dodecilsulfato de sodio
SFB	suero fetal bovino
SIN	<i>self-inactivated</i>
SN	sobrenadante de cultivo
SPF	<i>specific pathogen free</i>
SPNglico	sitios potenciales de N-glicosilación
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
SV40	virus símico 40
t	tiempo
t _{1/2elim}	tiempo de vida media terminal
TAE	solución de Tris-acetato-EDTA
Tat	transactivador viral
TBS	solución de Tris
Td	transducción
TE	solución de Tris-EDTA
TFA	ácido trifluoroacético
TLR	<i>Toll like receptor</i>
T _{máx}	tiempo para alcanzar la C _{máx}
TNF	factor de necrosis tumoral
TNFR	receptor del factor de necrosis tumoral
TR	transcriptasa reversa
tPA	activador del plasminógeno tisular
TpC	extremo C-terminal de la hTPO
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminoetano
TYK2	<i>tyrosine kinase-2</i>
Tween 20	polisorbato 20
UG	unidades de glucosa
UPLC	cromatografía líquida de ultra <i>performance</i>
UV	ultravioleta
VC	volúmenes de columna
V _D	volumen de distribución
VEGF	factor de crecimiento del endotelio vascular
VSV	virus de la estomatitis vesicular

WAX	cromatografía de intercambio aniónico débil
<i>wb</i>	<i>western blot</i>
<i>wt</i>	<i>wild type</i>
X	concentración de células
X _M	concentración de células muertas
X _T	concentración de células totales
X _V	concentración de células vivas

CÓDIGO DE UNA Y TRES LETRAS PARA AMINOÁCIDOS

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

UNIDADES

cm	centímetro
mm	milímetro
μm	micrómetro
nm	nanómetro
cm^2	centímetro cuadrado
kg	kilogramo
g	gramo
mg	miligramo
μg	microgramo
ng	nanogramo
l	litro
ml	mililitro
μl	microlitro
h	hora
min	minuto
s	segundo
M	molar
mM	milimolar
μM	micromolar
nmol	nanomol
Ω	Ohm
pmol	picomol
U	unidades
UI	unidades internacionales
kDa	kilodalton
rpm	revoluciones por minuto
V	voltio
W	vatio
% (V/V)	mililitros de solvente en 100 ml de solución
% (P/V)	gramos de soluto en 100 ml de solución
A	amperio
$^{\circ}\text{C}$	grado Celsius

RESUMEN

La producción de proteínas recombinantes de uso terapéutico es llevada a cabo principalmente mediante el empleo de células CHO-K1. Sin embargo, las células HEK293 constituyen un huésped de interés debido a la capacidad de las primeras de producir glicanos con determinantes antigénicos para humanos y la propiedad de las segundas de resultar beneficiosas para lograr una óptima actividad biológica del producto final. Ambas líneas celulares han permitido llevar a cabo con éxito la producción de nuevos bioterapéuticos y su aprobación por parte de los organismos regulatorios para su empleo en salud humana.

El hIFN- α 2b constituye una citoquina de gran interés para la industria farmacéutica ya que puede ser empleada como agente antiviral y antitumoral. La principal desventaja asociada al empleo de esta proteína como agente terapéutico se basa en que posee un tiempo de vida media plasmática muy corto por lo que se requieren dosis elevadas y frecuentes para alcanzar el efecto terapéutico deseado, resultando en la aparición de efectos adversos. Por este motivo, se han desarrollado numerosas estrategias que han permitido mejorar las propiedades farmacocinéticas del hIFN- α 2b, tal es el caso de la glicoingeniería, que condujo a la obtención de una variante hiperglicosilada, denominada IFN4N.

En el presente trabajo de tesis se llevó a cabo la generación de líneas y clones celulares recombinantes de células CHO-K1 y HEK293 productores de IFN4N, mediante el empleo de la tecnología de vectores lentivirales de tercera generación para la transferencia de material genético a la célula huésped. Los resultados demostraron las ventajas de este sistema sobre las metodologías tradicionales de transfección. Posteriormente, el IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} fueron producidos en condiciones de adherencia y purificados mediante cromatografía de inmunoafinidad (CIA).

La caracterización fisicoquímica de ambas moléculas evidenció que el IFN4N_{CHO} presentó una masa molecular aparente superior respecto del IFN4N_{HEK} y un mayor contenido de isoformas ácidas. En el contexto de la caracterización glicosídica se observó que la variante producida en células CHO posee N-glicanos altamente ramificados con un mayor contenido de ácido siálico respecto de la molécula obtenida a partir de células HEK. Ensayos de HILIC-UPLC seguidos de espectrometría de masas revelaron que la variante IFN4N derivada de células humanas posee N-glicanos truncos o simples, entre los cuales se detectó la presencia de GlcNAc bisectante, mientras que en la variante proveniente de células de hámster predominaron estructuras bi-, tri-, y tetraantenarias con extensiones LacNAc completamente sialiladas.

Estudios de farmacocinética revelaron la existencia de diferencias significativas sólo en los valores de concentración plasmática máxima y el tiempo requerido para alcanzarla, mientras que la velocidad de depuración y el tiempo de vida media plasmática no demostraron diferencias estadísticas.

Si bien ensayos de actividad biológica antiviral *in vitro* demostraron similitud entre el IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK}, la actividad antiproliferativa específica (ABE) *in vitro* resultó dos veces superior para la variante obtenida a partir de células HEK. El análisis de la actividad biológica antitumoral *in vivo* permitió confirmar los resultados obtenidos *in vitro*, demostrando así la mayor potencia antitumoral del IFN4N_{HEK}.

Como parte de este trabajo de tesis también se llevó a cabo la generación de nuevas muteínas hiperglicosiladas del hIFN- α 2b, con el objetivo de optimizar la molécula del IFN4N desde el punto de vista de su grado de glicosilación y, en consecuencia, de su farmacocinética, así como también de su actividad biológica antiproliferativa *in vitro*. Las estrategias propuestas involucraron la introducción de nuevos sitios potenciales para N-glicosilación, la restauración de la modificación R23N (involucrada en el descenso de la ABE antiproliferativa del IFN4N) y la fusión del péptido ANITVNITV en el extremo N-terminal de la secuencia de la proteína. Las nuevas muteínas fueron producidas a partir de clones recombinantes de células CHO-K1 generados mediante transducción con partículas lentivirales de tercera generación. Una vez purificadas mediante CIA, las nuevas muteínas fueron caracterizadas.

El estudio de las nuevas moléculas permitió observar que el grado de glicosilación de las mismas se incrementó conforme aumentó el número de sitios potenciales para N-glicosilación. Si bien las variantes 4N evidenciaron una masa molecular aparente y un contenido de ácido siálico similar al observado para el IFN4N (IFN3NM47 e IFN2NM47/95), las muteínas 5N (IFN4NM47, IFN3NM47/95) y 6N (IFN4NMutNter e IFN3N47MutNter) presentaron un notable incremento en las mismas. Esto se tradujo en un aumento del tiempo de vida media plasmática y una disminución de la velocidad de depuración.

Las variantes carentes de la modificación R23N (IFN3NM47, IFN2NM47/95, IFN3N47MutNter e IFN3NM47/95) evidenciaron valores de ABE antiproliferativa *in vitro* superiores respecto del IFN4N. Mientras que las muteínas IFN4NM47 e IFN4NMutNter, que conservaron dicha mutación, presentaron comportamientos diferentes: la primera con una ABE similar a la variante de referencia y la segunda con un valor superior.

Las variantes que mejor representaron el incremento en la ABE *in vitro* (IFN3NM47), el incremento de las propiedades farmacocinéticas (IFN4NM47) o el mejoramiento simultáneo de ambas cualidades (IFN3N47MutNter) fueron evaluadas en ensayos de actividad antitumoral *in vivo*. Tales muteínas fueron capaces de reducir la velocidad de crecimiento de los tumores respecto del IFN4N, resultando las variantes IFN4NM47 e

IFN3N47MutNter las más promisorias para reducir significativamente el volumen de los tumores respecto del tratamiento con IFN4N.

Los resultados de esta tesis demuestran que la búsqueda de un balance apropiado entre la AB *in vitro* y las propiedades farmacocinéticas en el contexto del huésped de producción adecuado, constituirían las claves para la obtención de un producto terapéutico innovador y efectivo.

SUMMARY

Nowadays, the production of recombinant therapeutic proteins is carried out mainly in CHO-K1 cells. However, HEK293 cells are also an interesting production host, considering the capacity of CHO cells to produce glycans which are antigenic for humans and the ability of HEK cells to introduce post-translational modifications that are essential for the biologic activity of the product. Besides, recombinant proteins produced in both cell lines have already been approved by regulatory agencies and are currently used as human therapeutics.

The antiviral and antitumor activity of rhIFN- α 2b makes it an interesting cytokine for the pharmaceutical industry. Nevertheless, as it is easily removed from circulation during the treatments, high doses of rhIFN- α 2b should be administered to the patients in order to reach the therapeutic effect, resulting in the appearance of undesired side effects. Many strategies have been designed with the aim of improving hIFN- α 2b *in vivo* biological activity. As a result, hyperglycosylated hIFN- α 2b called IFN4N was previously developed in our laboratory.

In the present thesis work IFN4N was produced in CHO and HEK cells in order to produce IFN4N_{CHO} and IFN4N_{HEK} variants. Third-generation lentiviral vectors were successfully used for cell line development and clones with higher productivities compared to others generated by traditional transfection methods were developed. Both molecules were produced in adherent conditions and highly purified by immunoaffinity chromatography.

Physicochemical characterization experiments showed that IFN4N_{CHO} exhibited a higher average molecular mass and more acidic isoforms compared to IFN4N_{HEK}. Consistently, sialic acid content was significantly higher for the CHO-derived IFN4N regarding the HEK-derived one. Also, IFN4N_{CHO} exhibited mainly bi-, tri-, and tetrasialylated structures while IFN4N_{HEK} contained mainly neutral and monosialylated glycans. Mass spectrometry analysis confirmed these results and revealed the presence of simple or truncated N-glycans containing bisecting GlcNAc in the human derived molecule while highly ramified glycans with LacNAc extensions were identified for the protein produced in hamster cells.

Despite more differences were expected in the pharmacokinetic behavior of the CHO- and HEK-derived IFN4N, significant differences were found only in their maximum concentration and in the time to reach it.

No statistical differences were found between the *in vitro* antiviral activities of both proteins. However, IFN4N_{HEK} exhibited a remarkably higher antiproliferative activity than IFN4N_{CHO} in different cell lines. Moreover, *in vivo* antitumor activity assays confirmed the *in vitro* results, since the HEK-derived IFN4N showed a higher antitumor potency compared to IFN4N_{CHO}.

As part of this thesis work new muteins of rhIFN- α 2b were designed and constructed in order to improve the glycosylation degree and, consequently, the pharmacokinetic properties, and the *in vitro* antiproliferative activity of IFN4N. The strategies used for this purpose involved the introduction of new potential glycosylation sites, the removal of the R23N mutation and the fusion of the ANITVNITV peptide sequence to the N-terminal end of the protein. The new molecules were produced by recombinant CHO-K1 clones that were generated using the third-generation lentiviral transduction technology. Then, they were purified by immunoaffinity chromatography with high recovery and purity values.

The characterization of the muteins showed that the introduction of new N-glycosylation sites resulted in the increment of their glycosylation degree. Even though the muteins with 4 potential N-glycosylation sites (IFN3NM47 and IFN2NM47/95) showed a similar molecular mass and sialic acid content compared to IFN4N, those properties exhibited increased values in the 5N (IFN4NM47 and IFN3NM47/95) and 6N (IFN4NMutNter and IFN3N47MutNter) variants. As a result, the new molecules presented improved pharmacokinetic properties with improved half-life and reduced plasma clearance.

The *in vitro* biological characterization showed that variants lacking the mutation R23N (IFN3NM47, IFN2NM47/95, IFN3N47MutNter and IFN3NM47/95) presented an increased antiproliferative activity. In addition, muteins IFN4NM47 and IFN4NMutNter, both retaining the mutation R23N, exhibited different behaviours: while IFN4NM47 showed a similar *in vitro* antiproliferative activity compared to IFN4N, IFN4NMutNter demonstrated a higher value.

The muteins which demonstrated the greatest increment of the *in vitro* antiproliferative bioactivity (IFN3NM47), the highest improvement of the pharmacokinetic properties (IFN4NM47) as well as the simultaneous enhancement of both qualities (IFN3N47MutNter) were evaluated in *in vivo* antitumor studies. The three new proteins were able to reduce the growth rate of the tumors compared to IFN4N. Moreover, IFN4NM47 and IFN3N47MutNter proved to be the most promising muteins for reducing the volume of the tumors regarding the reference variant.

The results of this thesis demonstrate that searching for an appropriate balance between the *in vitro* biological activity and the pharmacokinetic properties in the context of an adequate production host would constitute the basis to generate an innovative and effective therapeutic product.



INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1. Expresión de proteínas recombinantes terapéuticas en células eucariotas

La elección del sistema de expresión para la producción de proteínas recombinantes terapéuticas depende de varios factores entre los cuales se destacan: las características de crecimiento del cultivo, los niveles de expresión buscados, la conformidad de que la proteína se exprese de manera intra o extracelular, las modificaciones postraduccionales esperadas, la actividad biológica del producto, así como también de asuntos relacionados a los aspectos económicos y a las pautas establecidas por las entidades regulatorias.

En la actualidad, los cultivos de células eucariotas dominan el campo de producción de proteínas recombinantes empleadas como agentes terapéuticos, para el diagnóstico y la prevención de enfermedades (Zhu, 2012). Si bien la utilización de sistemas procariotas se caracteriza por ser más rápida y económica y las líneas celulares eucariotas ofrecen bajas productividades específicas de proteínas recombinantes, estas últimas constituyen el sistema de elección ya que permiten llevar a cabo el correcto procesamiento y plegamiento de la proteína de interés y además introducen modificaciones postraduccionales apropiadas. Es por esto que para producir bioterapéuticos para humanos la balanza costo-beneficio se inclina a favor del sistema eucariota (Almo y Love, 2014).

Numerosos sistemas de expresión eucariotas han sido estudiados y evaluados con el objetivo de lograr niveles elevados de expresión de la proteína recombinante en estudio. En las últimas dos décadas se han llevado a cabo grandes mejoras no sólo relacionadas al huésped elegido para la producción, sino también en lo que respecta a la construcción y diseño de vectores, optimización de codones, amplificación de genes, métodos de transfección, entre otros. Sin embargo, es imperativo llevar a cabo la optimización del bioproceso a los fines de obtener el producto de interés en grandes cantidades y con las características buscadas (Zhang, 2010; Xiao y col., 2014).

1.1. Líneas celulares empleadas para la producción de proteínas recombinantes

Una amplia variedad de proteínas recombinantes terapéuticas aprobadas al día de hoy para el tratamiento de diversas patologías son producidas a gran escala empleando células CHO, derivadas de ovario de hámster chino (*Chinese Hamster Ovary*), células BHK, derivadas de riñón de hámster bebé (*Baby Hamster Kidney*) y células NS0, derivadas de mieloma murino. Todas ellas han demostrado ser seguras para la producción de diversas proteínas recombinantes de uso terapéutico (Durocher y Butler, 2009; Estes y Melville, 2014).

Las células BHK y NS0 crecen en condiciones de adherencia. Las primeras han permitido llevar a cabo la producción de vacunas y proteínas que participan de la cascada

de coagulación sanguínea como el FVIIa y FVIII. Las segundas se han utilizado principalmente para la producción de anticuerpos monoclonales (mAbs) (Durocher y Butler, 2009; Zhu, 2012; Dumont y col., 2015).

La línea celular CHO-K1 fue aislada por Theodore Puck a fines de los años 50 (Puck y col., 1958) y constituye una plataforma de producción robusta y confiable. Se caracteriza por su fácil adaptación al crecimiento en suspensión y en condiciones libre de suero fetal bovino (SFB) lo que permite llevar a cabo su cultivo en altas densidades celulares. De este modo, el incremento de la concentración de la proteína recombinante de interés en el sobrenadante de cultivo y la ausencia de proteínas contaminantes características del SFB (así como también virus y priones) permiten simplificar los procesos posteriores de recuperación, purificación y refinamiento del producto final (Bandaranayake y Almo, 2014). Además, desde el punto de vista regulatorio, las células CHO constituyen un huésped de producción adecuado ya que son incapaces de replicar patógenos humanos como HIV (virus de la inmunodeficiencia humana), *H. influenza*, poliovirus y herpesvirus, entre otros (Jayapal y Wlaschin 2007).

La variabilidad genómica de las células CHO ha permitido aislar líneas celulares mutantes deficientes en enzimas metabólicas. La supervivencia de estas células depende de la presencia de ciertos nutrientes, es por esto que dicha dependencia puede ser usada como marcador de selección para la generación de líneas celulares productoras de proteínas recombinantes. Un ejemplo muy utilizado es la línea celular deficiente en la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) (Bandaranayake y Almo, 2014; Urlaub y Chasin, 1980).

En el año 2002 se inició un proyecto de colaboración entre investigadores de la Universidad de Minnesota y del Instituto de Ingeniería de Bioprocesos de Singapur que permitió obtener 2 bibliotecas de ADN copia (ADNc) a partir de la secuenciación de 3 genomas de células CHO. Estos resultados promovieron la fundación del consorcio para el estudio del genoma de células CHO (*Consortium on Chinese Hamster Ovary Cells Genomics*) en el año 2006. El principal objetivo de este consorcio, que involucró también a numerosas empresas de la industria biotecnológica y farmacéutica, fue promover y facilitar el empleo de células CHO para el descubrimiento de nuevas drogas mediante el incremento de la calidad y eficiencia de producción de medicinas (Jayapal y Wlaschin 2007; Bandaranayake y Almo, 2014).

El empleo de líneas celulares recombinantes derivadas de células CHO presenta ciertas desventajas ya que requiere de la identificación de clones que evidencien las propiedades fenotípicas buscadas, incluyendo el tiempo de duplicación del cultivo y su viabilidad a largo plazo como así también la uniformidad y calidad del producto. De este modo, la elección del clon apropiado resulta un desafío ya que se ha descrito que puede

sufrir cambios fenotípicos a lo largo del tiempo que afectan las características de la proteína producida (Jadhav y col., 2013). Particularmente, la variación en el grado de glicosilación constituye un factor que puede afectar tanto la función como la estabilidad de las proteínas, es por esto que se ha vuelto un punto de control importante para productos producidos en células CHO. Además, esta línea celular puede introducir epitopes inmunogénicos para humanos que también deben ser controlados a los fines de evitar reacciones inmunes en los pacientes (Costa y col., 2014). Se han reportado dos epitopes glicosídicos críticos que pueden despertar la respuesta inmune en humanos. Uno de ellos es el residuo α -Gal (Gal α 1,3Gal), inicialmente detectado en productos derivados de células murinas, pero luego también identificado en proteínas producidas mediante el cultivo de células CHO (Bosques y col., 2010). La síntesis de este residuo terminal requiere de la enzima α 1,3-galactosiltransferasa (Macher y Galili, 2008), inactiva en humanos, simios y monos pero presente en la mayoría de otras especies de mamíferos (Brooks, 2004). El otro epitope antigénico es el ácido glicolilneuramínico (Neu5Gc), ácido siálico terminal característico de células animales no primates. El mismo se sintetiza mediante la adición de un grupo hidroxilo al ácido acetilneuramínico (Neu5Ac), proceso que es llevado a cabo por una hidroxilasa, ausente en células humanas (Ghaderi y col., 2012).

El primer producto producido a partir de células animales, específicamente células CHO, fue el activador tisular del plasminógeno humano (tPA), aprobado para su comercialización en el año 1987. Desde entonces, las células CHO han sido empleadas para la producción de numerosas proteínas recombinantes de uso terapéutico como: eritropoyetina, ETANERCEPT® (proteína de fusión entre el receptor del factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) y la porción cristalizable de la IgG₁ humana Fc γ ₁), FVIII, HUMIRA® (anticuerpo monoclonal anti-TNF- α), entre otras. En la actualidad, más del 70% de las proteínas terapéuticas aprobadas son producidas en células CHO, mientras que sólo un 8% se obtienen a partir de células humanas (Almo y Love, 2014; Kantardjieff y Zhou, 2014; Xiao y col. 2014, Dumont y col., 2015). Si bien las células CHO constituyen la plataforma más utilizada para la producción de biofarmacéuticos, la necesidad de obtener proteínas recombinantes más eficaces y seguras ha impulsado el desarrollo de líneas celulares recombinantes de origen humano.

Casi dos décadas después del descubrimiento de las células CHO, la línea celular HEK293 (*Human Embryonic Kidney*), derivada de células renales embrionarias de origen humano, fue establecida por Frank Graham y col. (1977), mediante transfección con fragmentos de ADN del adenovirus 5. Las células HEK293 expresan la proteína 13 S E1a del adenovirus de manera estable, lo cual permite incrementar de manera significativa la transcripción de genes que se encuentran bajo la dirección del promotor de citomegalovirus (CMV) (Gorman y col., 1989). Esta línea celular puede crecer en adherencia, en presencia

de SFB, o bien en suspensión, en condiciones libres de suero. Es muy empleada para la expresión de proteínas recombinantes de manera transitoria, debido a su facilidad de transfección. Además es utilizada en el ámbito académico para la generación de líneas celulares recombinantes estables ya que ofrece elevados niveles de expresión de la proteína de interés y crece fácilmente (Fliedl y col., 2015; Dumont y col., 2015).

El empleo de herramientas de modificación genética sobre la línea celular HEK293 permitieron dar origen a dos líneas celulares nuevas: HEK293E y HEK293T (Pham y col., 2006). Las células HEK293E expresan constitutivamente el antígeno nuclear 1 del virus de Epstein Barr (EBV) mientras que las células HEK293T expresan el antígeno T grande del virus SV40 de manera estable. Ambas líneas celulares son capaces de sostener la replicación episomal y amplificar plásmidos que contengan el origen de replicación del EBV o del SV40, respectivamente. Particularmente, las células HEK293E permiten lograr niveles elevados de producción de proteínas recombinantes en forma transitoria, motivo por el cual son las más empleadas en la actualidad para la producción a gran escala. Las células HEK293T no son capaces de alcanzar los mismos niveles de producción, sin embargo son muy utilizadas con fines terapéuticos para la producción de partículas adenovirales, retrovirales, lentivirales y virus adenoasociados, por lo que muchas ellas en la actualidad, se encuentran en fases II y III de estudios clínicos (Pham y col., 2006; Swiech y col., 2012).

A la hora de producir proteínas recombinantes de uso terapéutico, las líneas celulares humanas son ampliamente consideradas debido a su capacidad de introducir modificaciones postraduccionales similares a las que se encuentran en proteínas naturalmente secretadas por humanos. De este modo, se evitan reacciones inmunes contra epitopes no humanos, presentes en los bioterapéuticos producidos en células no humanas. Particularmente, las células derivadas de hámster, carecen de enzimas tales como α 2-6 sialiltransferasa, α 1-3/4 fucosiltransferasa y transferasa de N-acetilglucosamina bisectante, necesarias para obtener un perfil de glicosilación similar al de proteínas humanas (Grabenhorst y col., 1999). Así, por ejemplo, las células HEK293 han sido empleadas con éxito para la sobreexpresión de interferón-alfa2b humano (hIFN- α 2b), ya que esta molécula evidenció un perfil de glicosilación muy similar al observado para el IFN secretado naturalmente por leucocitos humanos (Loignon y col., 2008). Además, en los últimos años, 5 proteínas recombinantes producidas en células HEK293 han llegado a la etapa de comercialización luego de su aprobación por parte de la entidad estadounidense FDA (*Food and Drug Administration*) y/o de la agencia europea de medicamentos (EMA, *European Medicines Agency*). Entre ellas podemos mencionar a las proteínas rFVIII₁ y rFIX₁ (ambas obtenidas como productos de la fusión del FVIII y FIX de la cascada de coagulación sanguínea a la porción Fc de una IgG₁, respectivamente), FVIII derivado de células humanas (human-cl rhFVIII) y una nueva proteína de fusión entre el péptido tipo 1

del glucagón y la región Fc de una IgG₄. Con respecto a las proteínas de fusión rFVIII₁₋₂ y rFIX₁₋₂, ambas fueron aprobadas por la FDA en el año 2014. Particularmente, la correcta actividad del FIX depende de su adecuada γ -carboxilación a nivel de determinados residuos de Glu, mientras que la sulfatación de residuos de Tyr es vital para la funcionalidad del FVIII. Por este motivo, el empleo de células humanas resultó ser la mejor opción ya que ambas modificaciones son eficientemente desarrolladas por tales células. Por otra parte, el human-cl rhFVIII (producido en células HEK293 adaptadas al crecimiento en suspensión) exhibió un perfil de glicosilación similar al FVIII derivado de plasma humano y no evidenció la presencia de los residuos glucídicos antigénicos (α -Gal y Neu5Gc). Este bioterapéutico fue recientemente aprobado por EMA y presentado a la FDA. Finalmente, la proteína de fusión entre un Fc y el péptido tipo 1 del glucagón, (conocido con el nombre genérico de dulaglutide y con el nombre comercial de TRULICITY[®]), ha sido aprobada por la FDA debido a su efectividad en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. Todos estos antecedentes demuestran la capacidad de las células HEK293 para producir proteínas recombinantes con fines terapéuticos (Durocher y Butler, 2009; Dumont y col., 2015; Fliedl y col. 2015).

Otra línea celular de origen humano utilizada para la producción de bioterapéuticos es la denominada HT-1080, derivada de fibrosarcoma con fenotipo epitelial. Esta línea ha permitido el desarrollo y producción de cuatro proteínas terapéuticas: epoetin delta (DYNEPO[®]), iduronate-2-sulfatase (idursulfase; ELAPRASE[®]), agalsidase alfa (REPLAGAL[®]) y velaglucerasa alfa (VPRIV[®]) (Swiech et al., 2012). Particularmente, DYNEPO[®] fue retirada del mercado por motivos comerciales (Dumont y col., 2015).

La línea celular Per.C6, derivada de retina humana, también constituye una potencial plataforma de producción de proteínas recombinantes, ya que ha demostrado su elevada capacidad de producción de proteínas con modificaciones postraduccionales acordes a las proteínas humanas (Díaz y col., 2009). Una gran variedad de productos derivados de esta línea celular se encuentran en fases clínicas II y III (Dumont y col., 2015).

1.2. Tecnologías empleadas para el desarrollo de líneas celulares productoras de proteínas recombinantes

La capacidad de la línea celular para ofrecer elevadas productividades volumétricas de la proteína en estudio dependerá de muchos factores, incluyendo: elementos de control transcripcional y traduccional, procesamiento del ARN, número de copias, estabilidad del ARNm, sitio de integración en el genoma, potencial toxicidad de la proteína recombinante en la célula huésped así como también de las propiedades genéticas de la célula productora (Zhang, 2010).

Para favorecer el proceso de generación de la línea celular productora de la proteína de interés es fundamental llevar a cabo un correcto diseño del vector de expresión.

El mismo debe contener los siguientes elementos: un promotor constitutivo o inducible con actividad transcripcional robusta, señales de procesamiento del ARNm y de traducción, codón de terminación de la traducción, marcadores de selección que permitan generar líneas celulares estables y amplificar la expresión, un origen de replicación procariota y marcadores de selección para bacterias (Makrides, 1999). A su vez, es deseable que la proteína pueda ser recuperada a partir del sobrenadante del cultivo celular para facilitar los procesos posteriores de purificación y refinamiento del producto final. Es por esto que se debe incluir la señal de secreción adecuada para cada proteína (Durocher y Butler, 2009).

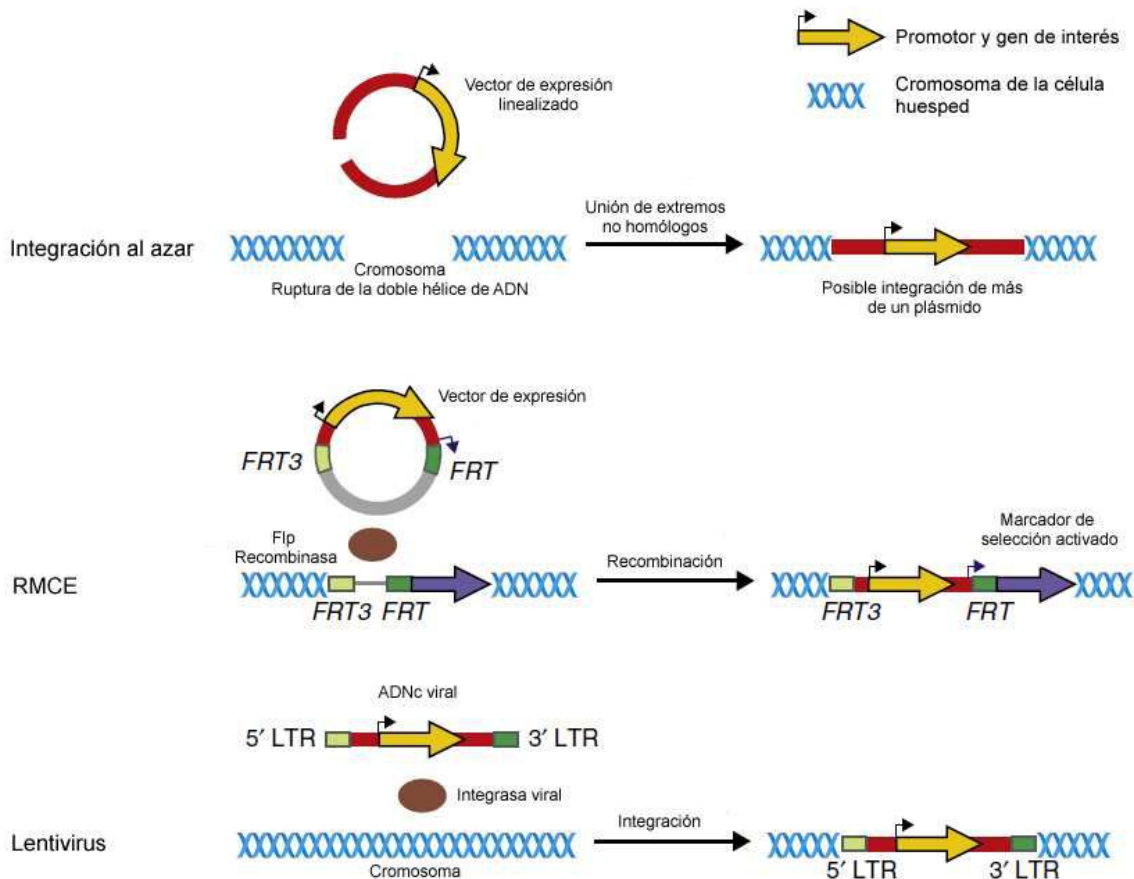


Fig. 1. Metodologías empleadas para la generación de líneas celulares estables productoras de proteínas recombinantes.

El material genético de interés, generalmente presentado como promotor y gen de interés y contenido dentro de un plásmido, puede integrarse en el genoma de la célula huésped al azar o mediante el empleo de metodologías de recombinación sitio-específica. La transferencia del gen de interés también puede llevarse a cabo empleando partículas lentivirales (adaptado de Bussöw, 2015).

Por otra parte, la accesibilidad y demás propiedades específicas de cada metodología de transferencia de material genético ejercen cierta influencia sobre el sitio del genoma en el cual se integrará el transgén de interés. La integración del mismo puede ocurrir en: sitios transcripcionalmente activos, regiones promotoras, secuencias codificantes o regiones intergénicas; conduciendo, en algunos casos, a la desregulación o a la

interrupción accidental de genes endógenos (Kruse y col., 2014). La mayoría de los procesos de producción de biofarmacéuticos utilizan, principalmente, sistemas de expresión en los cuales el transgén de interés se integra en el genoma celular de manera aleatoria (Fig. 1). Dentro de este tipo de procedimientos se puede mencionar la “infección” con una partícula viral, proceso también conocido como “transducción” o bien, la transferencia directa del ADN plasmídico (Makrides 1999; Zhang 2010). En los últimos años, se han descrito metodologías en las cuales la integración del mencionado transgén se lleva a cabo en sitios del genoma previamente caracterizados que permiten predecir la productividad específica de los clones celulares resultantes (Fig. 1) (Durocher y Butler, 2009).

1.2.1. Expresión transitoria de proteínas recombinantes

La expresión transitoria del transgén de interés es un método conveniente para la rápida obtención de pequeñas cantidades de proteína recombinante que permitan llevar a cabo su caracterización inicial. Además, permite evaluar la funcionalidad del vector construido, así como también optimizar diferentes combinaciones de promotores y otros elementos útiles para la expresión de la proteína recombinante. La implementación de esta tecnología presenta ciertas desventajas asociadas a la productividad específica de la proteína en estudio, la densidad de células a transfectar y la heterogeneidad del producto. Para sortear estos obstáculos es importante contar con metodologías de transfección eficientes que permitan transferir numerosas copias del vector a la célula. Se han desarrollado diferentes metodologías cuya eficiencia depende no sólo del tamaño del plásmido que se desea introducir en la célula sino también de la línea celular en cuestión, siendo CHO y HEK293 las líneas celulares más utilizadas para la producción de proteínas recombinantes en forma transitoria (Baldi y col., 2007; Noh y col., 2013). Las metodologías más empleadas en la actualidad involucran el empleo de polímeros catiónicos como polietilenimina (PEI), precipitación con fosfato de calcio y formación de complejos lípidos catiónicos-ADN. Las dos primeras metodologías son más económicas, siendo el PEI el más empleado para la producción a gran escala de proteínas de manera transitoria en células HEK293. Por otra parte, los lípidos catiónicos se utilizan en escalas menores y resultan ser los reactivos más eficientes para la transferencia de genes a células CHO (Geisse, 2009; Geisse y Fux, 2009).

1.2.2. Expresión estable de proteínas recombinantes

La generación de líneas celulares que expresen el transgén de interés de forma permanente depende de la integración estable del plásmido en el cromosoma celular. La principal desventaja asociada al empleo de líneas celulares estables radica en que se requiere de un tiempo prolongado para su generación, en comparación con la expresión

transitoria de proteínas. Tradicionalmente, la generación de líneas celulares recombinantes estables se ha llevado a cabo mediante el empleo de la metodología de transfección que resulta en una baja frecuencia de integración del transgén de interés en el genoma celular. En el contexto de la línea celular, sólo unas pocas células presentarán la secuencia del vector integrada en regiones con una elevada tasa de transcripción que permita obtener cantidades suficientes de la proteína en estudio. Es por esto que la etapa de selección es sumamente importante a los fines de que sobrevivan sólo aquellas células que hayan incorporado el transgén de interés al genoma celular. De todos modos, cuando el cultivo de la línea celular es prolongado pueden ocurrir procesos de silenciamiento del mencionado transgén, llevando a la pérdida de productividad de la línea celular. Es por esto que resulta de gran importancia aislar y caracterizar un gran número de clones, lo cual puede llevar largos meses de trabajo. A pesar de que las líneas estables se caracterizan por producir la proteína de interés de manera uniforme e indefinidamente en el tiempo, en la actualidad se ha demostrado que la expresión estable y la expresión transitoria de proteínas se utilizan con la misma frecuencia. Afortunadamente, el desarrollo de nuevas tecnologías ha permitido mejorar notablemente los procesos de generación de líneas celulares y selección de clones productores, facilitando la obtención de buenos candidatos para la producción de la proteína en estudio y reduciendo los tiempos requeridos para su generación (Zhang, 2010; Büssow, 2015). A continuación se mencionan algunos de los sistemas que han permitido alcanzar las mejoras anteriormente mencionadas.

1.2.2.1. Sistemas para la amplificación de la expresión del gen de interés

El sistema de expresión de la DHFR, enzima metabólica esencial para la síntesis de purina y pirimidina, ha sido muy utilizado para la producción de proteínas recombinantes ya que permite lograr la amplificación del número de copias del transgén hasta 1000 veces, lográndose niveles elevados de expresión de la proteína recombinante. Esta enzima es inhibida en presencia del análogo de ácido fólico metotrexato (MTX). En este sistema de expresión, células CHO deficientes en el gen DHFR (CHO DHFR-) deben ser transfectadas con un vector que contenga el transgén de interés y el gen DHFR. El empleo de MTX en concentraciones crecientes durante sucesivas rondas permitirá seleccionar aquellas células que demuestren una elevada capacidad de producción de la enzima DHFR y, por lo tanto, de la proteína de interés. La principal desventaja de esta metodología radica en que requiere de aproximadamente 5 rondas de selección por lo que la generación de la línea celular puede llevar más de un año (Matasci y col., 2008; Zhang, 2010).

Otro sistema de amplificación consiste en emplear células CHO y cultivarlas en presencia del inhibidor de la glutamina sintetasa (GS): metionina sulfoximina (MSX). Dicha enzima es fundamental para la síntesis de glutamina a partir de glutamato y amonio y, en

consecuencia, para la supervivencia de la línea celular en momentos de privación de dicho nutriente en el medio de crecimiento. Mediante el proceso de transfección se puede introducir en las células un vector que codifique para la GS y la selección se realiza empleando MSX, de modo que las células que no hayan incorporado el vector de interés morirán durante el proceso de selección. En este caso no se requieren rondas de amplificación (Birch y col., 2005).

1.2.2.2. Ingeniería de genomas: modificaciones sitio dirigidas

Independientemente del método elegido para la transferencia del material genético, una vez que el transgén se integra al genoma celular el sitio de integración resulta ser un factor crucial que afectará su estabilidad y nivel de expresión. En los protocolos de transferencia de material genético “al azar”, el sitio de integración del transgén de interés es impredecible y resulta ser la principal causa de la heterogeneidad de expresión entre clones individuales. Este fenómeno es conocido como “efecto de posición”. Numerosos esfuerzos se han realizado con el objetivo de desarrollar nuevas estrategias que permitan llevar a cabo la manipulación de células eucariotas de manera efectiva, confiable y predecible. Recientemente han surgido nuevas metodologías que permiten direccionar el *cassette* de expresión hacia sitios del genoma previamente caracterizados. Estas estrategias permiten sortear los obstáculos asociados al “efecto de posición” y así alcanzar niveles elevados de expresión de la proteína codificante.

La tecnología de intercambio de *cassette* mediado por una recombinasa o *Recombinase Mediated Cassette Exchange* (RMCE) permite llevar a cabo el intercambio de dos secuencias de ADN entre el genoma celular y un plásmido que contiene el transgén de interés. Como su nombre lo indica, este procedimiento es catalizado por una recombinasa que reconoce secuencias heteroespecíficas de ADN. De esta manera, la reacción entre cada una de las secuencias mencionadas será independiente, evitando reacciones cruzadas y permitiendo la integración de una secuencia de ADN en un sitio específico del genoma (Mueller y col., 2003; Wirth y Hauser, 2004; Wirth y col., 2007).

1.2.2.3. Transferencia de genes mediante el empleo de vectores lentivirales

Los lentivirus (LVs) son miembros de la familia *Retroviridae* (retrovirus) y se caracterizan por expresar una transcriptasa reversa (RT), que permite convertir el ARN viral en ADN, y una integrasa (IN) que introduce la información del genoma viral en el genoma celular de manera estable. A diferencia de otros retrovirus, los LVs se pueden replicar en células que no se encuentren en división (Dropulic, 2011; Sakuma y col., 2012). Además, presentan un elevado tropismo hacia diversos tipos celulares. Una gran ventaja de este

sistema radica en que las células transducidas mantienen el transgén en su genoma luego de sucesivas etapas de división.

Los vectores lentivirales han sido contruidos a partir de diversos tipos de lentivirus, siendo el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) el más estudiado y utilizado en la actualidad. Inicialmente, el empleo de LVs requería de la implementación de diversas medidas de seguridad debido a la posible generación de partículas lentivirales competentes replicativas (RCLs). A los fines de minimizar el riesgo de formación de dichas RCLs y mejorar su eficiencia se han desarrollado varias “generaciones” de vectores lentivirales (Picanço-Castro y col., 2012).

Los vectores lentivirales de primera generación contienen los genes gag y pol (necesarios para la expresión de proteínas estructurales y enzimáticas del virión) y genes accesorios provenientes del HIV-1 mientras que la glicoproteína de envoltura fue reemplazada por la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G). Asimismo, para el correcto ensamblaje de la partícula, los siguientes elementos debían estar junto al transgén de interés: las señales de empaquetamiento y dimerización (Ψ), los elementos LTRs (*long terminal repeats*) necesarios para la transcripción, retrotranscripción e integración del genoma viral y el elemento RRE o elemento de respuesta a Rev (proteína regulatoria responsable de la transcripción viral y exportación nuclear de los transcritos). Además, la presencia de Tat (transactivador viral) resultaba fundamental para la actividad del promotor 5´LTR (Sakuma y col., 2012).

En la segunda generación de lentivirus todos los genes accesorios presentes en los vectores lentivirales fueron eliminados al demostrarse que sólo eran necesarios para la patogenicidad de los LVs y su replicación (Sakuma y col., 2012).

Los vectores de la tercera generación atravesaron un cambio fundamental que consistió en la modificación de los LTR. Brevemente estos elementos poseen regiones U3, R y U5. U3 actúa como promotor/*enhancer* y R funciona en el extremo 3´ como una señal de poliadenilación. En esta generación, el U3 del 5´LTR fue reemplazado con un promotor viral fuerte como el de CMV o RSV (virus del sarcoma de Rous) (Dull y col., 1998; Kim y col., 1998; Sakuma y col., 2012). Además, se llevó a cabo la remoción de una parte del U3 ubicado en el LTR del extremo 3´. Los cambios introducidos dieron lugar a los vectores SIN (self-inactivated) (Dull y col., 1998). Luego del proceso de transcripción, la delección en la región U3 del 3´LTR es transferida a la región U3 del LTR presente en el 5´, resultando en la inactivación del promotor. Esta modificación reduce la posibilidad de formación de RCLs aún en casos de infecciones con el virus nativo (Cockrell y Kafri 2007; Picanço-Castro y col., 2012).

La tercera generación de vectores lentivirales consta de cuatro plásmidos. Uno de ellos contiene los genes de gag y pol. El segundo es un plásmido que permite la expresión

de Rev. El tercer plásmido codifica para la glicoproteína G de envoltura y el cuarto plásmido contiene el transgén de interés cuya expresión es dirigida por un promotor heterólogo fuerte (Fig. 2). La transfección de células HEK293 o HEK293T con estos cuatro plásmidos y su correcta recombinación permite llevar a cabo el ensamblado de partículas lentivirales (Dropulic y col., 2011; Sakuma y col., 2012). La ausencia de RCL en muestras de producción de lentivirus a gran escala conteniendo $1,4 \cdot 10^{10}$ unidades de transducción permitió sustentar la elevada seguridad de los vectores lentivirales de tercera generación (Escarpe y col., 2003).

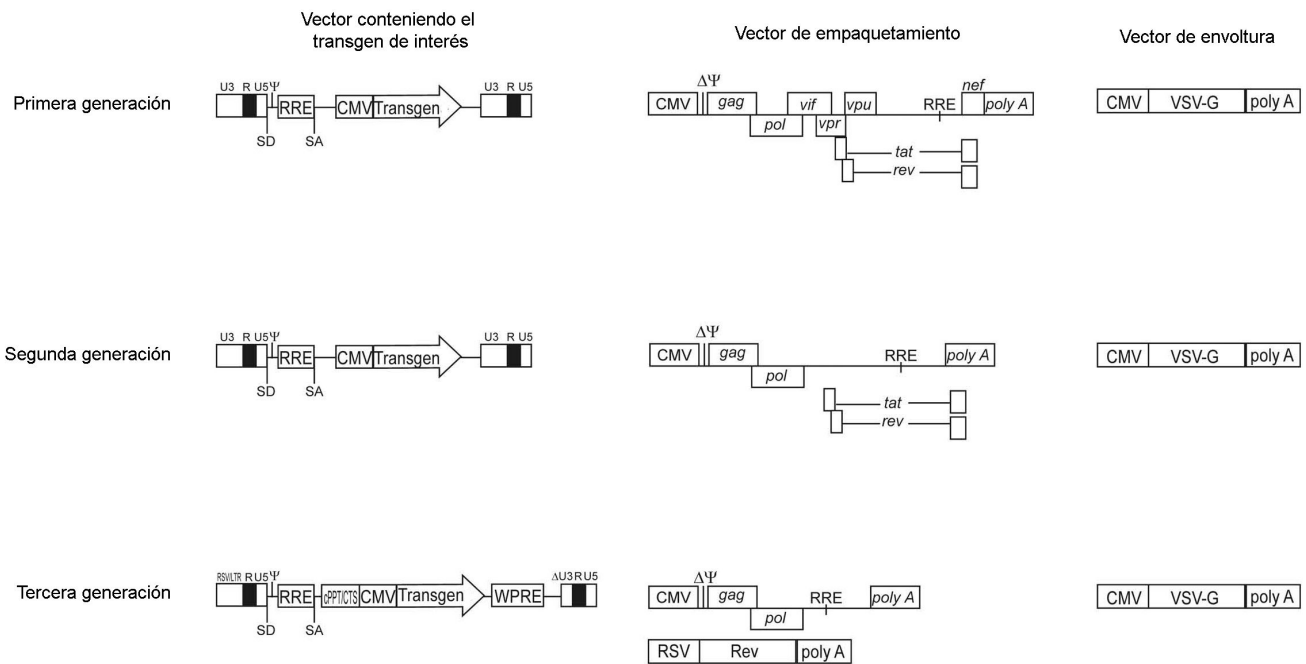


Fig. 2. Primera, segunda y tercera generación de vectores lentivirales

La primera generación de vectores lentivirales contiene los genes estructurales gag y pol y demás genes accesorios del HIV-1. La glicoproteína de envoltura fue reemplazada por la del VSV, que le confiere la habilidad de transducir un amplio rango de células de mamíferos. Además, las señales de empaquetamiento (Ψ), LTRs y el elemento de respuesta a REV deben estar junto al transgén de interés. En la segunda generación de vectores se removieron gran parte de los genes accesorios para incrementar su seguridad. En la tercera generación se desarrollaron los vectores SIN, incrementando aún más la seguridad de este sistema, el cual consta de cuatro plásmidos conteniendo los genes gag y pol, VSV-G, el elemento de respuesta a Rev y el transgén de interés (adaptado de Picanço-Castro y col., 2012).

Los LVs derivados del HIV-1 han sido utilizados de manera exitosa como vehículos para la transferencia de genes en terapia génica (Wiznerowicz y Trono, 2005). Específicamente, se ha demostrado que los vectores lentivirales presentan una elevada frecuencia de integración en regiones codificantes, permitiendo así la elevada expresión de los transgenes que transfieren (Wu y col., 2003; Mitchell y col., 2004; Kruse y col., 2014). Este resultado impulsó su empleo para la generación de líneas celulares estables productoras de proteínas recombinantes, obteniéndose como resultado líneas celulares con

elevadas productividades específicas de las proteínas complejas como el FVIII, la EPO y diversos anticuerpos. La plataforma de lentivirus ha sido implementada tanto en células CHO como en células HEK293 (Oberbek y col., 2011; Baranyi y col., 2013; Mufarrege y col., 2014).

2. Interferón

2.1. Un poco de historia

El Interferón (IFN) fue descubierto por los investigadores Isaacs y Lindenmann en el año 1957, al detectar la presencia de un material soluble, secretado por las células frente a la exposición con un virus. Su nombre fue establecido considerando su capacidad de “interferir” y proteger a las células frente a la infección viral. Además, se observó que el interferón era capaz de proveer inmunidad a las células frente a nuevos procesos infecciosos ocasionados por otros virus. Con el tiempo se pudo demostrar la capacidad de células somáticas provenientes de diferentes especies de producir IFN (Isaacs y Lindenmann, 1957; Merigan, 1967; Vilçek y Feldmann, 2004).

Luego de su descubrimiento se llevaron a cabo numerosos intentos de producción y purificación del IFN humano (hIFN). Recién luego de dos décadas, en el año 1978, se logró obtener IFN purificado a homogeneidad. La aplicación de la cromatografía líquida de alta resolución en fase normal y fase reversa permitió llevar a cabo de manera exitosa la purificación de IFN, para su posterior empleo en estudios químicos, biológicos e inmunológicos (Rubinstein y col., 1978; Friesen y col., 1981; Rubinstein y col., 1981).

2.2. La familia IFN

Los IFNs constituyen una gran familia de proteínas clasificadas como citoquinas α -helicoidales, que presentan roles cruciales tanto en la respuesta inmune innata frente a la infección con virus, como así también en el establecimiento de la respuesta inmune adaptativa que confiere inmunidad antiviral a largo plazo (Tovey y col., 2008; Content, 2009; Barral y col., 2009). En humanos, la superfamilia IFN está constituida por 3 subfamilias: IFN tipo I, IFN tipo II e IFN tipo III. La clasificación se realiza en función de su capacidad para unirse a receptores del mismo tipo. Cada IFN es designado con una letra griega (Jonasch y Haluska, 2001; Borden y col., 2007; Tovey y Lallemand, 2010).

Los IFNs de tipo I (IFN-I) están principalmente representados por el IFN- α , IFN- β , IFN- ω , IFN- ϵ e IFN- κ . Todos ellos se unen a un mismo receptor heterodimérico de alta afinidad, el cual está compuesto por dos cadenas polipeptídicas de transmembrana, IFNAR-1 e IFNAR-2. Dentro de la familia de IFN tipo II se encuentra el IFN- γ que se une a un receptor de transmembrana específico. Este último se compone de dos cadenas polipeptídicas denominadas IFNGR1 e IFNGR2. Por último, entre los integrantes de la

familia de IFN tipo III se pudieron identificar IFN- λ 1, IFN- λ 2 e IFN- λ 3, también conocidos con el nombre de determinadas interleuquinas (IL): IL-29, IL-28A e IL-28B, respectivamente. Todos ellos se unen a un receptor común ubicado en la superficie celular, el cual está compuesto por una cadena IFN λ R1 y la cadena IL-10R2, que además forma parte de otro complejo de receptor para IL-10, IL-22 e IL-26 (Tovey y Lallemand, 2010; Witte y col., 2010).

2.3. El sistema IFN

Al descubrirse los interferones, los virólogos se interesaron por dos propiedades básicas de los mismos. Por un lado, el IFN carecía de efectos citotóxicos. Por otro lado, a diferencia de los antivirales sintéticos conocidos hasta ese momento, el IFN presentaba actividad antiviral frente a una gran variedad de virus. Estas propiedades impulsaron el estudio del sistema IFN que fue descrito y aceptado a fines de los años 60 (Billiau y col., 2006; El-Baky y Redwan, 2015).

A nivel celular el sistema IFN consiste en dos procesos. Por un lado, el proceso de inducción/producción y, por el otro, el proceso de acción. A continuación, se describe el mecanismo general que involucra los dos procesos antes mencionados. Los virus que ingresan a la célula exponen su material genético (ADN o ARN) que será replicado por la maquinaria de la célula huésped y conducirá al ensamblado de nuevos virus que posteriormente podrán infectar a células vecinas. A su vez, el ácido nucleico extraño envía señales al núcleo celular que conducen a la desregulación de los genes de IFN, permitiendo su síntesis. La secreción del IFN a partir de la célula productora ocurre de manera rápida y generalmente precede a la generación de nuevos virus. La interacción del IFN con su receptor específico presente en la superficie de células vecinas conduce a la transmisión de señales intracelulares que resultan en la activación de la expresión de genes codificantes para proteínas capaces de interrumpir la replicación viral (Fig. 3, Billiau y col., 2006).

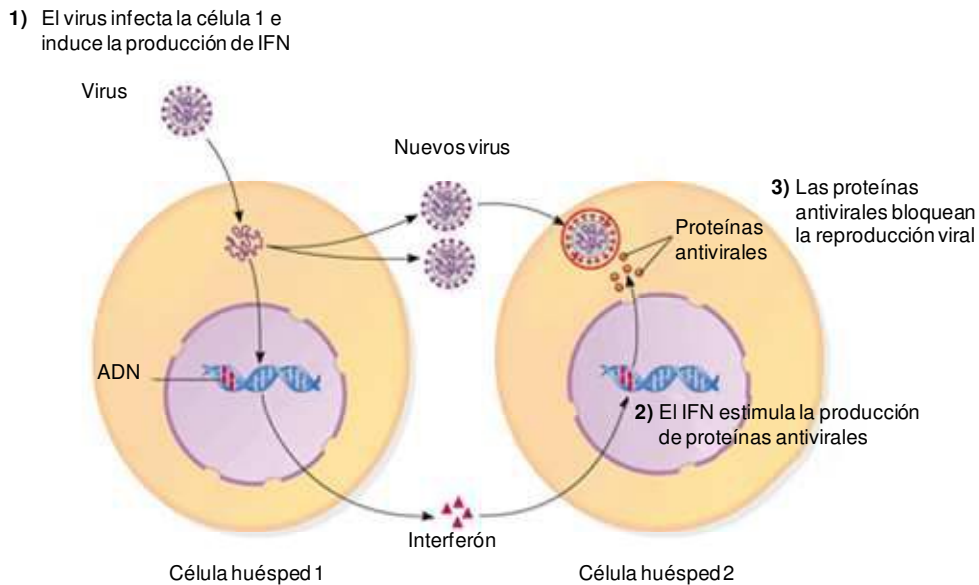


Fig. 3. El sistema IFN: Inducción, producción y acción.

El material genético del virus estimula la producción de IFN que al ser secretado podrá interactuar con receptores presentes en la superficie de células vecinas. Dicha interacción conduce a la producción de proteínas antivirales que protegerán a la célula frente a la infección viral.

Adaptado de: <http://www.mtchs.org/BIO/text/chapter31/concept31.2.html>

Si bien inicialmente se observó que la producción de IFN ocurría frente a la infección viral, se ha demostrado que diversos motivos moleculares asociados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*-PAMPs) también promueven la producción de esta citoquina luego de interactuar con receptores específicos. Particularmente, existen diferentes estímulos que inducen a las células metabólicamente activas a la producción de IFN. Entre ellos podemos mencionar: la infección con diferentes virus, micoplasmas, bacterias y protozoos, así como también la exposición a ciertas citoquinas y factores de crecimiento como el CSF-1 (colony-stimulating factor-1), TNF, IL-1 e IL-2. El ARNdc proveniente del genoma viral o de la replicación del mismo, es el principal inductor de la transcripción de los genes de IFN, mientras que los virus constituidos por ADN son inductores menos potentes de su síntesis (Sen y Lengyel, 1992; George y col., 2012). Por otra parte, los receptores capaces de identificar dichos estímulos más estudiados y caracterizados son los TLRs (*Toll like receptors*). Los TLRs 1, 2, 4, 5 y 6 se localizan en la superficie de la membrana celular e interactúan con lipopolisacáridos y lipopéptidos bacterianos. Los TLRs 3, 7, 8 y 9 se encuentran a nivel intracelular y reconocen específicamente ácidos nucleicos de origen viral. La unión ligando-receptor dispara una cascada de señalización cuidadosamente regulada que permite la activación de familias de factores de transcripción (incluyendo NF- κ B e IRF3) que conducen a la expresión de citoquinas inflamatorias como TNF- α , IL-6, IFN- γ e IFN- β . Este último actúa de manera autocrina y paracrina sobre el receptor de IFN-I, conduciendo a la activación de factores de

transcripción (principalmente IRF1) que permiten la expresión de IFN- α . De este modo, se genera un ciclo positivo de retroalimentación que permite amplificar la respuesta de los IFNs de tipo I y conduce a la rápida expresión de ISGs (*IFN-stimulated genes*) (Borden y col., 2007; George y col., 2012).

2.4. IFN-I

Los IFNs-I son proteínas producidas por células eucariotas. Contienen entre 160 y 200 aminoácidos y comparten entre un 30 y 55% de homología. Exhiben actividad antiviral, antiproliferativa e inmunomoduladora. Además, son capaces de regular el metabolismo y la diferenciación celular. Si bien cualquier célula puede producir IFN-I, éstos son principalmente secretados a partir de células dendríticas plasmocitoides. En humanos, los genes correspondientes a la familia IFN-I carecen de intrones, se localizan en el brazo corto del cromosoma 9 y codifican para 12 subtipos de IFN- α funcionales y un solo tipo de IFN- β , IFN- ω , IFN- ϵ e IFN- κ . El número de genes de IFN-I es variable entre mamíferos y además existen especies que presentan variantes únicas, tal es el caso de los cerdos, capaces de producir IFN- δ , los roedores, capaces de producir IFN- ζ y los rumiantes, en los cuales se detectó IFN- τ (Sen y Lengyel, 1992; Jonasch y Haluska, 2001; Borden y col., 2007; Meyer y col., 2009; Tovey y Lallemand, 2010).

2.5. Receptores de IFN-I. Mecanismo de transducción de señales

El IFN-I demuestra la mayor potencia antiviral comparada con el resto de los miembros de esta superfamilia. Es por esto que fue el primero en ser purificado, lo cual condujo al estudio exhaustivo de su receptor.

Los IFNs-I no son proteínas efectoras. Es por esto que para poder ejercer su acción necesitan interactuar con receptores específicos presentes en la superficie de diferentes tipos celulares. El consecuente inicio de la cascada de señales permite desencadenar las múltiples actividades de esta familia pleiotrópica de citoquinas. Los IFNs-I no son específicos de especie, es decir que pueden interactuar con receptores presentes en la superficie celular de huéspedes diferentes. De todos modos, presentan mayor potencia biológica sobre receptores celulares de su misma especie. Además, el receptor de IFN-I tiene la capacidad de distinguir entre los diferentes tipos y subtipos de IFN y así desencadenar la respuesta biológica apropiada (Sen y Lengyel, 1992; Krause y Pestka, 2007).

El complejo del receptor de IFN-I consiste en dos subunidades denominadas IFNAR-1 e IFNAR-2 (*IFN alpha receptor 1 y 2*, respectivamente), codificadas en el cromosoma 21. Ambas subunidades de origen humano (HuIFNAR-1 y HuIFNAR-2) constituyen proteínas glicosiladas y, al igual que los IFNs, pertenecen a la familia de

citoquinas α -helicoidales de tipo II (Uzé y col., 1992). Las subunidades IFNAR-1 e IFNAR-2 poseen regiones conservadas compuestas por fibronectina estructural que forman el dominio extracelular de unión al ligando. Los dominios transmembrana no poseen actividad enzimática intrínseca, mientras que los dominios citoplasmáticos se asocian de manera no covalente a tirosina kinasas, requeridas para la presentación productiva del sitio de unión (Uzé y col., 1992; Novick y col., 1994; Stark y col., 1998).

El IFNAR-1 humano presenta 530 aminoácidos de los cuales 409 constituyen el dominio extracelular, 21 conforman el dominio transmembrana y 100 aminoácidos representan la fracción intracelular. Para el IFNAR-2 humano se han aislado tres variantes diferentes. El IFNAR-2c presenta la cadena completa de aminoácidos que comprende 487 aminoácidos los cuales representan 115 kDa. Sólo esta variante completa es capaz de asociarse al IFNAR-1 y mediar la respuesta biológica. Las variantes IFNAR-2a e IFNAR-2b consisten en variantes más cortas del receptor. IFNAR-2a presenta 40 kDa e IFNAR-2b posee 55 kDa (Chuntharapai y col., 1999; Novick y col., 1994; Ling y col., 1995; Pfeffer y col., 1997; Bekisz y col., 2004).

Cuando el IFN se une al dominio extracelular del complejo receptor se produce la activación de distintas vías de señalización, conocidas como Jak/STAT. Concretamente, los dominios IFNAR-1 e IFNAR-2 se asocian facilitando la transfosforilación de las enzimas TYK-2 (*Tyrosine kinase-2*) y JAK-1 (*Janus kinase-1*) y, en consecuencia, su activación. Luego TYK-2 fosforila a IFNAR-1 creando un sitio de unión para STAT2 (*signal transducer and activator of transcription*) que también será fosforilado por TYK-2 y, de este modo, servirá como plataforma para reclutar a STAT1 que finalmente recibirá la misma modificación. El heterodímero STAT1/STAT2 fosforilado se disocia del complejo del receptor y se transloca al núcleo donde se asociará a la proteína de unión al ADN p48, para formar el complejo de transcripción heterotrimérico ISGF3. Este último se une a secuencias ISRE (*IFN stimulated response element*), presentes en genes que responden al IFN α/β . La proteína p48 es miembro de la familia IRF y muchas veces puede aparecer indicado como IRF-9 (Goodbourn y col., 2000; Billiau 2006).

IFNAR-1 se une al IFN con una afinidad 1000 veces menor con respecto a IFNAR-2. El procedimiento mediante el cual se forma el complejo ternario constituido por IFNAR1, IFN e IFNAR-2 consiste de dos etapas. En la primera el IFN se une a una de las subunidades del receptor y en la segunda etapa se recluta a la segunda subunidad. La interacción inicial con IFNAR-2 presenta una mayor probabilidad de éxito (Borden y col., 2007). Es importante mencionar que si alguna de las dos subunidades del receptor está ausente no se producirá la unión del ligando con elevada afinidad y por lo tanto no se desencadenará la cascada de señalización. En consecuencia, la actividad biológica del IFN

no será ejecutada (Bekisz, 2004). En la Fig. 4 se muestra un esquema sencillo de lo descrito en este apartado.

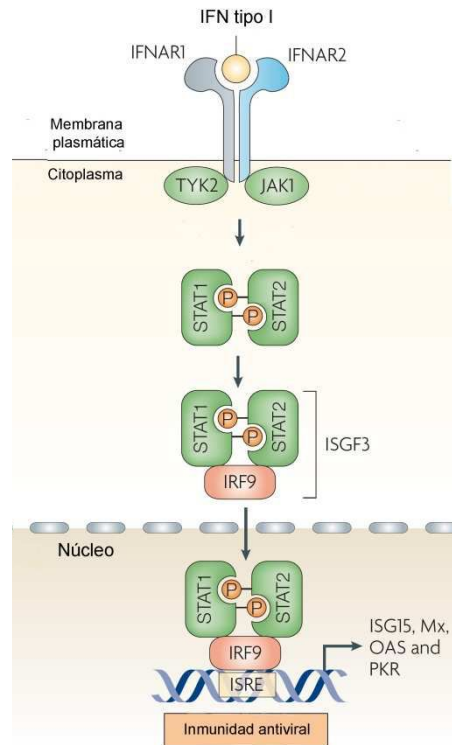


Fig. 4. Unión del IFN a su receptor y transducción de señales.

Los IFN-I interaccionan con un receptor de membrana formado por dos subunidades: IFNAR-1 e IFNAR-2; ambas presentan dominios citoplasmático, transmembrana e intracelular. La unión ligando-receptor conduce a la activación de las quinasas TYK-2 y JAK-1 y la fosforilación de STAT1 y STAT2. La interacción de estas últimas con p48 permite formar el complejo ISGF3 que se transloca al núcleo permitiendo iniciar o amplificar la transcripción de genes que codifican para las proteínas mediante las cuales los IFNs ejercen su acción biológica (Adaptado de Sadler y Williams, 2008).

2.6. Actividad biológica de los IFN-I

2.6.1. Actividad biológica antiviral

El sistema IFN puede interferir en diferentes etapas de la replicación viral que incluyen la penetración del virus en la célula, su desnudamiento, transcripción, traducción y ensamblaje de la progenie viral. A su vez, el modo de acción del IFN dependerá de la presencia o ausencia de infección previa de la célula. En las células infectadas los IFN promueven la apoptosis, mientras que en las células no infectadas generan un estado antiviral (Sen y Lengyel, 1992; Sotoca Momblona, 1999)

Se conocen al menos 4 vías a través de las cuales los IFNs pueden ejercer su actividad antiviral. Cada una de estas vías involucra a diferentes proteínas entre las cuales podemos mencionar: Mx (proteínas de resistencia a *myxovirus*), OAS (*2'-5'-oligoadenylate synthetase*), PKR (*Protein kinase R*) y la proteína ISG15 (*IFN-stimulated protein de 15 kDa*).

A su vez los IFNs pueden activar mecanismos de apoptosis que involucran la producción de TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*). Esta característica les confiere la habilidad no sólo de contribuir a la actividad antiviral, sino también a los efectos antitumorales (Goodbourn y col., 2000; Meyer, 2009).

Las proteínas Mx pertenecen a la familia de “GTPasas grandes”, son inducidas por IFN y se encuentran altamente conservadas. Ejercen su efecto antiviral mediante el reconocimiento de proteínas virales, particularmente polimerasas, bloqueando su acción o interfiriendo en su translocación a compartimentos subcelulares. De este modo, evitan el desarrollo de diversos virus ARN a nivel de la transcripción viral y otras etapas de su ciclo de vida (Goodbourn y col., 2000; Billiau 2006).

Las OAS consisten en un grupo de enzimas inducidas por IFN en células animales que catalizan la síntesis de oligonucleótidos de adenosina unidos por enlace fosfodiéster en una conformación inusual 2´-5´ (2´5´A). Las moléculas 2´5´A se unen con una elevada afinidad a la endorribonucleasa L (ARNasa L) e inducen su activación a través de la dimerización. La ARNasa L activada cataliza el clivaje de ARN simple cadena (ARNsc), incluyendo ARNm, conduciendo a la inhibición de la síntesis de proteínas. Teniendo en cuenta que el 2´5´A es muy lábil, la activación de la ARNasa L depende de la activación local de la 2´-5´OAS celular, asegurando la destrucción preferencial de los transcritos virales por encima de los ARNm celulares (Goodbourn y col., 2000).

La PKR inducible por IFN es una serina/treonina quinasa que presenta múltiples funciones en el control de la transcripción y traducción. Presenta dos dominios muy bien caracterizados: en su extremo N-terminal se encuentra el dominio regulatorio que contiene un sitio de unión a ARNdc mientras que su extremo C-terminal constituye el dominio catalítico que contiene dominios conservados con actividad proteína quinasa. La PKR reconoce ARNdc de al menos 50 pares de bases (pb), se activa y fosforila a la subunidad α del eIF2 (factor de iniciación de la transcripción), causando la inhibición de la síntesis de proteínas virales y celulares. Además, la sobreexpresión de PKR induce apoptosis por medio de mecanismos dependientes de caspasas y asociados a Bcl-2 (gen antiapoptótico) (Goodbourn y col., 2000).

La ISG15 constituye un homólogo de la ubiquitina. Se han identificado al menos 158 proteínas blancas de ISG15, muchas de las cuales presentan roles importantes en la respuesta de IFN-I, incluyendo los componentes de la vía de señalización JAK/STAT, proteínas efectoras de la actividad antiviral como Mx, PKR y ARNasa L, entre otras. Además, ISG15 previene la degradación del factor de regulación de IFN 3 (IRF3), incrementando la expresión de IFN- β (Sadler y Williams, 2008).

2.6.2. Actividad biológica antiproliferativa

La capacidad del IFN de inhibir el crecimiento ha sido extensamente estudiada y se ha descrito que la sensibilidad frente al efecto antiproliferativo del IFN es dependiente de la línea celular. Si bien los sistemas OAS/ARNasa L y PKR/eIF2 fueron definidos como mediadores de la actividad antiviral, también cumplen funciones como efectores de la actividad antiproliferativa.

Por un lado, los niveles de PKR en un cultivo celular pueden variar de acuerdo al nivel de crecimiento del mismo, lo cual se correlacionaría con los niveles de fosforilación de eIF2. Esto sugiere que aún en ausencia de ARNdc, PKR puede presentar actividad residual debido a la presencia de un activador celular y así disparar sus funciones antiproliferativa y antitumoral. Por otro lado, se ha demostrado que la sobreexpresión de OAS de 40 kDa conduce a la reducción de la velocidad de crecimiento de las células transfectadas.

Los IFNs tienen la capacidad de regular el ciclo celular, prolongándolo. Se ha demostrado que aumentan los niveles del inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina, p21, que posee un rol crucial en el progreso desde la fase G1 hasta la fase S. Otro potente represor del ciclo celular es el producto del gen p202, también inducido por IFN. Además los IFNs pueden disminuir la transcripción y expresión de varios oncogenes (*c-myc*, *c-mos*, *c-abl*, *c-Haras*, *c-sis*, *c-src*), algunos de ellos necesarios para el progreso del ciclo celular. De este modo, inhiben la proliferación del tumor (Sotoca Momblona, 1999; Goodbourn y col., 2000; Meager 2002).

2.6.3. Actividad biológica inmunomoduladora

Como se mencionó anteriormente, los IFNs son importantes moduladores de la respuesta inmune innata y adaptativa.

Todos los miembros de la familia IFN comparten la capacidad de incrementar la expresión de proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (CMH I) y, por lo tanto, promueven la respuesta de linfocitos T CD8+. Contrariamente, sólo el IFN- γ es capaz de inducir la expresión de CMH de clase II y así promover la respuesta de linfocitos T CD4+. Los IFNs también presentan un rol crucial en el procesamiento de antígenos ya que regulan la expresión de muchas proteínas involucradas en la generación de péptidos antigénicos que serán presentados en asociación con las proteínas del CMH I.

Una de las funciones inmunomoduladoras más importante de los IFNs- α/β consiste en incrementar la citotoxicidad de células *natural killer* (NK) mediante la regulación positiva de los niveles de perforinas. Además pueden actuar como estimuladores de la proliferación de células NK al inducir la producción de IL-15 a partir de monocitos/macrófagos. La IL-15 también promueve la división de linfocitos T de memoria. Los IFNs estimulan la síntesis de las citoquinas IL-1, IL-6 y TNF, las cuales aumentan la expresión de receptores para el

fragmento Fc de las inmunoglobulinas y para la fracción C3 del complemento (Goodbourn y col., 2000; Meager, 2002).

2.7. IFN- α humano

A principios de 1980, para esta citoquina se describió una familia de 18 genes carentes de intrones, de los cuales 4 de ellos constituyen pseudogenes. En términos de expresión, las proteínas para las cuales codifican los genes mencionados permiten obtener 12 variantes relacionadas de IFN- α . Los diversos subtipos del IFN- α humano se distinguen entre sí mediante la utilización de nomenclatura numérica. Dentro de esta familia podemos nombrar al IFN- α 1, IFN- α 2, IFN- α 4, IFN- α 5, IFN- α 6, IFN- α 7, IFN- α 8, IFN- α 10, IFN- α 13, IFN- α 14, IFN- α 16, IFN- α 17, IFN- α 21 e IFN- α 22 (Nagata y col., 1980; Streuli y col., 1980; Bekisz y col., 2004).

El IFN- α es producido principalmente por leucocitos en respuesta a estímulos apropiados. Cada una de las proteínas que componen la subfamilia IFN- α contiene 189 aminoácidos (excepto el IFN- α 2 que posee 188 aminoácidos), de los cuales 23 representan el péptido señal que será removido mediante modificaciones postraduccionales. Los diferentes subtipos presentan un 42% de identidad (79 residuos absolutamente conservados) y comparten entre un 70 y 80% de homología. Asimismo, evidencian un 35% de identidad con el IFN- β (El-Baky y Redwan, 2015). El IFN- α 2 posee tres variantes alélicas: IFN- α 2a, IFN- α 2b e IFN- α 2c que difieren entre sí en los aminoácidos ubicados en las posiciones 23 y 34. El IFN- α 2a posee Lys en la posición 23 e His en la 34, el IFN- α 2b presenta la misma configuración que el anterior con la diferencia de que contiene Arg en el residuo 23 y el IFN- α 2c posee Arg tanto en la posición 23 como en la 34 (Kontsek, 1994; Bekisz y col., 2004).

La masa molecular teórica promedio de los diferentes subtipos de IFN- α es 18,5 kDa. Sin embargo, la masa molecular de las citoquinas mencionadas secretadas naturalmente y evaluadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida varía entre 19 y 26 kDa. Estas variaciones pueden estar dadas debido a la presencia de modificaciones postraduccionales (Goodbourn y col., 2000; El-Baky y Redwan, 2015). Consecuentemente, los diferentes subtipos de IFN- α presentan diferentes puntos isoeléctricos (pI) que se distribuyen en el rango entre 4,5 y 7 (Kruzel y col., 1993; Kontsek, 1994). La actividad biológica específica del IFN- α es del orden de 10^8 unidades internacionales (UI) por mg de proteína (Rubinstein y col., 1979; Ruiz y col., 2006).

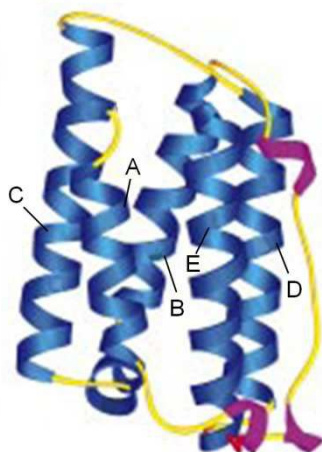
Sólo dos subtipos de IFN- α se encuentran glicosilados. El IFN- α 14 se encuentra N-glicosilado en la Asn72 (Nyman y col., 1998a; Nyman y col., 1998b), mientras que el IFN- α 2 es el único subtipo que ha demostrado la presencia de O-glicosilación en la Thr106.

Este subtipo, que incluye las tres variantes alélicas, es el único que posee el aminoácido mencionado en esa posición (Adolf y col., 1991; Nyman y col., 1998b).

2.7.1. Estructura del IFN- α

Cada monómero del hIFN- α 2b, producto de la cristalización, presenta dimensiones de 40x30x20 Å y está compuesto de 5 hélices α que involucran las regiones aminoacídicas indicadas a continuación entre paréntesis: hélice A (Ser11-Met21), hélices B y B' (Thr52-Ser68 y Lys70-Ala75), hélice C (Glu78-Ile100), hélice D (Leu110-Glu132) y hélice E (Pro137-Leu157), lo que permite clasificar a esta proteína dentro del grupo de las citoquinas α -helicoidales, como se mencionara anteriormente. Las hélices se encuentran unidas mediante una conexión sobresaliente larga (lazo AB) y tres segmentos más cortos (lazos BC, CD y DE). La topología de la molécula se asemeja al motivo de 4 hélices α , en este caso denominadas A, B, C y E, pero se distingue de la estructura clásica mediante su hélice D, la cual está formada por 20 residuos y se une al núcleo mediante una interacción hidrofóbica entre la Thr120 y la Thr121 con la Thr138 de la hélice E. Cada una de las hélices es aproximadamente recta. Sólo la hélice B constituye una excepción ya que contiene una curvatura aproximada de 70° centrada en la Thr69. La extensión de la hélice B desde los residuos 70 a 75 se denomina B' (Fig. 5, Radhakrishnan y col., 1996).

Los residuos críticos para la actividad óptima de los diferentes subtipos del hIFN- α consisten en Lys conservadas y ubicadas en el extremo N-terminal y Tyr cercanas al extremo C-terminal. La estructura del hIFN- α incluye cuatro residuos de Cys conservados en las posiciones 1, 29, 99 y 139. Los residuos mencionados participan en la formación de dos puentes disulfuro que ocurren entre los pares 1-99, 29-139. Si bien el primero no es esencial, el segundo es fundamental para la actividad biológica de la proteína. El núcleo de la molécula es hidrofóbico, pero contiene algunos residuos polares ocultos que forman varios puentes de hidrógeno que unen las hélices A, C, D y E (Wetzel, 1981; Kontsek, 1994; Vilcek y Sen, 1996; Runkel y col., 1998; El-Baky y Redwan, 2015).



<u>A</u>				<u>B</u>	
CDLPQTHSLG	SRRTLMLLAQ	MRKISLFSCLKDRHDFGFQ	EEFGNQFQKA	ETIPVLHEMI	
<u>B'</u>		<u>C</u>		<u>D</u>	
QQIFNLFSTK	DSSAAWDETL	LDKFYTELYQ	QLNDLEACVI	QGVGVTTETPL	MKEDSILAVR
<u>D</u>		<u>E</u>			
KYFQRITLYL	KEKKYSPCAW	EVVRAEIMRS	FSLSTNLQES	LRSKE	

Fig. 5. Estructura molecular y secuencia aminoacídica del hIFN-α2b.

Representación gráfica en forma de cintas de la estructura tridimensional del hIFN-α2b. Las hélices α se designan con las letras correspondientes. Además, se muestra la secuencia aminoacídica del hIFN-α2b, indicando los residuos que integran cada una de las hélices descriptas (Adaptado de Radhakrishnan y col., 1996).

2.7.2. Interacción entre el IFN-α y el receptor para IFN-I (IFNAR)

Con el objetivo de estudiar las regiones moleculares relevantes en la interacción del IFN-α con las subunidades IFNAR-1 e IFNAR-2 del receptor para IFN-I, se llevaron a cabo ensayos de mutagénesis sitio-dirigida (Piehler y Schreiber, 1999; Piehler y col., 2000; Roisman y col., 2001).

El estudio de la interacción entre el IFNAR-1 y el IFN-α2 reveló la importancia de los aminoácidos His57, Glu58, Gln61, Phe64, Asn65, Tyr69, Leu80, Tyr85 y Tyr89, indicando que el sitio de unión del IFN-α a dicha subunidad se encontraría en el centro de las hélices B y C. Sin embargo, no se identificó ningún residuo cuya mutación anule la interacción (Fig. 6a) (Piehler y col., 2000; Roisman y col., 2001).

En un comienzo se reconoció la importancia del lazo AB, y en menor medida de la hélice D, para la interacción del IFN-α con la subunidad IFNAR-2 y el desarrollo de su actividad. Sin embargo, el mapeo de residuos en la estructura del IFN-α2 indicó la posibilidad de que la interfase de unión ligando-receptor también se extienda hacia la hélice E. La mutación puntual de residuos individuales presentes en la superficie de la hélice E permitió designar a los aminoácidos Arg144, Ala145, Met148 y Arg149 como responsables de la unión al IFNAR-2. La modificación de los residuos mencionados causó una disminución de 20 veces en la afinidad al receptor, mientras que la mutación de S152 y L153

provocó una reducción de entre 6 y 13 veces. El análisis de la hélice A reveló que la Leu15 también está involucrada en la unión del IFN- α al IFNAR-2. En la hélice D sólo Lys133 contribuye a la energía de unión. Por otra parte, los residuos Leu30, Arg33 ubicados en el lazo AB contribuyen significativamente a la interacción con el receptor, mientras que Leu26, Phe27, Lys31, Asp32 y His34 lo hacen en menor medida (Fig. 6b; Piehler y col., 2000; Roisman y col., 2001).

Los estudios de mutagénesis realizados para evaluar el sitio de interacción entre el IFN- α 2 y el receptor IFNAR también permitieron determinar la importancia de ciertos residuos para la actividad biológica antiviral y antiproliferativa de esta citoquina. La única mutación que causó un incremento significativo (2 veces) en la actividad antiviral del IFN fue E58A. En cambio, las modificaciones L80A, Y85A y Y89A de manera individual provocaron una disminución de 5 veces. La combinación de las mutaciones mencionadas en una misma molécula causó una caída en la potencia antiviral del IFN- α 2 de 30 veces. Al adicionar a la triple mutante una cuarta mutación (N65A) el descenso en la actividad de la citoquina fue de 100 veces. El análisis de la actividad antiproliferativa permitió determinar que las mutaciones descritas anteriormente presentaron el mismo efecto, pero de manera más acentuada. Es decir, las modificaciones E58A y Q61A permitieron incrementar la potencia antiproliferativa del IFN- α 2, mientras que N65A, T69A, L80A, Y85A y Y89A causaron una reducción significativa. Las mutantes múltiples LYY y NLYY redujeron su actividad antiproliferativa 180 y 1100 veces, respectivamente. En general, se observó que la mayoría de las mutaciones que mostraron un cambio en la afinidad de unión tuvieron un efecto más pronunciado sobre la actividad antiproliferativa que sobre la actividad antiviral, lo cual indicaría que la afinidad de unión a IFNAR1 está directamente relacionada con la actividad antiproliferativa del IFN (Roisman y col., 2005).

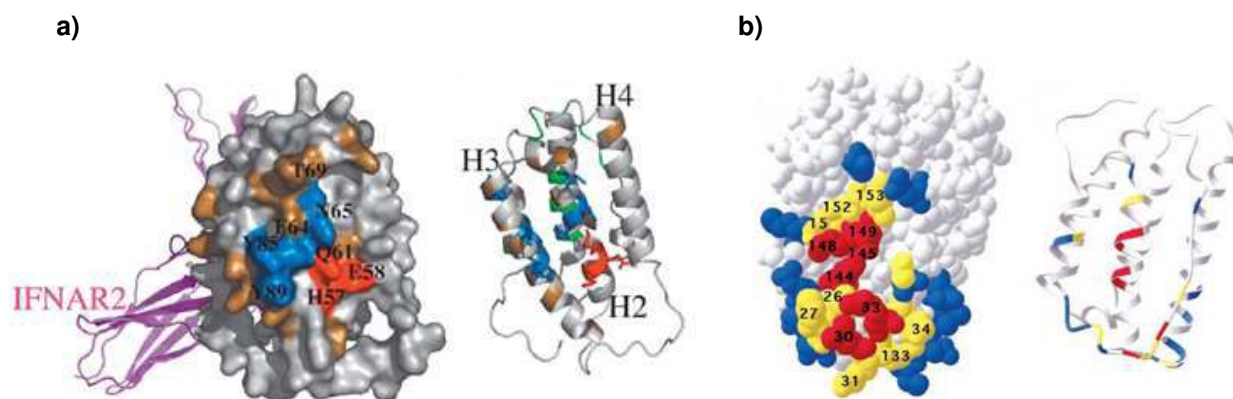


Fig. 6. Localización de los aminoácidos del hIFN- α 2 implicados en la unión a la subunidad IFNAR1 (A) e IFNAR-2 (B) del receptor.

Se muestran representaciones tridimensionales de la molécula de IFN- α 2, indicándose con diferentes colores la contribución de los aminoácidos a la región molecular que interacciona con la subunidad IFNAR-1 (A) e IFNAR-2 (B), respectivamente.

- a) En el sector izquierdo se muestra una representación de la interacción de la subunidad IFNAR2 (en formato de cinta) con la citoquina (en formato de esferas de Van der Waals). En el sector derecho se muestra una representación de la citoquina (en formato de cinta). En ambos casos los residuos que producen un aumento o disminución de la afinidad de unión al IFNAR1 luego de su mutación se colorean con rojo o azul, respectivamente. Los residuos que se unen al IFNAR2 se muestran en verde. Los residuos que no muestran un efecto significativo en la interacción se señalan en marrón (adaptado de Roisman y col., 2005).
- b) Representación de la citoquina mediante esferas de Van der Waals (izquierda) o de cintas (derecha). Los residuos claves en la interacción con IFNAR2 se señalan en rojo, los que evidencian un efecto significativo en la estabilización del complejo se colorean con amarillo y los aminoácidos inertes en la unión al receptor se indican en azul (adaptado de Piehler y col., 2000).

2.8. Sistemas de expresión para la producción del hIFN- α 2 recombinante

En términos de investigación bioquímica básica y desarrollo de nuevos biofarmacéuticos, el sistema de expresión procarionta (*E. coli*) aún constituye la opción más elegida para llevar a cabo la producción de IFN. Esto se debe a que los genes de esta superfamilia carecen de intrones y a que la mayoría de ellos codifican para proteínas no glicosiladas. Este sistema presenta la ventaja de alcanzar rápidamente densidades celulares elevadas, dando como resultado la producción de gran cantidad de proteína. Sin embargo, ésta se obtiene bajo la forma de cuerpos de inclusión donde generalmente se encuentra en una elevada proporción de estructura no nativa, requiriendo procedimientos de renaturalización para recuperar su conformación natural y, en consecuencia, su actividad biológica (El-Baky y Redwan, 2015).

Con el objetivo de sortear los obstáculos presentados en la producción de IFN- α humano recombinante (rhIFN- α) en bacterias, se han empleado otros sistemas tales como la expresión en células eucariotas que incluyen: levaduras, células de insectos, células de

mamíferos y también sistemas de expresión libres de células. Las ventajas y desventajas de estos sistemas se resumen en la Tabla I.

Tabla I. Ventajas y desventajas de los diferentes sistemas de expresión empleados para la producción de rhIFN- α

Sistema de expresión	Ventajas	Desventajas
<i>E.coli</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Alta velocidad de crecimiento • Elevada productividad de la proteína • Bajo costo 	<ul style="list-style-type: none"> • Ausencia de modificaciones co- y postraduccionales similares a las producidas en células eucariotas • El uso de codones es diferente respecto de las células eucariotas • Producen proteínas insolubles
Levaduras	<ul style="list-style-type: none"> • Alta velocidad de crecimiento • Elevada productividad de la proteína • Bajo costo • Adecuado plegamiento de la proteína 	<ul style="list-style-type: none"> • Carecen de modificaciones postraduccionales complejas
Líneas celulares de mamíferos	<ul style="list-style-type: none"> • Adecuado plegamiento de la proteína • Modificaciones postraduccionales simples y complejas 	<ul style="list-style-type: none"> • Velocidades de crecimiento muy lentas • Baja productividad de la proteína • Elevado costo
Líneas celulares derivadas de insectos	<ul style="list-style-type: none"> • Elevada productividad de la proteína • Adecuado plegamiento de la proteína • Modificaciones postraduccionales simples y complejas 	<ul style="list-style-type: none"> • Velocidades de crecimiento muy lentas • Elevado costo
Sistemas libres de células	<ul style="list-style-type: none"> • Rápida optimización de los constructos de expresión • Elevada productividad de la proteína • Las condiciones de reacción pueden ser modificadas para mejorar problemas de solubilidad de la proteína 	<ul style="list-style-type: none"> • Elevado costo

Adaptado de El-Baky y Redwan, 2015

2.9. Usos clínicos del rhIFN- α 2

Los efectos antivirales del IFN- α junto con su potencial actividad antitumoral condujeron a la producción del hIFN- α a gran escala con el objetivo de proceder a ensayos clínicos que permitan llevar a cabo su evaluación en enfermedades virales y tumorales. Inicialmente, se llevó a cabo la producción de la citoquina mencionada a partir de leucocitos

inducidos con virus Sendai, molécula que llegó a ser evaluada en ensayos clínicos en el año 1974.

Sin embargo, tiempo después, el hIFN- α 2 fue el primer subtipo de IFN- α en ser clonado, convirtiéndose en el primer IFN y la primera citoquina en ser producida y comercializada por la industria farmacéutica (Paul y col., 2015). De este modo, las dos variantes alélicas de hIFN- α 2 producidas en *E.coli* fueron aprobadas por la FDA en el año 1986 para el tratamiento de leucemia de células vellosas y comercializados bajo la denominación ROFERON-A[®] (rhIFN- α 2a) por Hoffmann La Roche, Inc. e INTRON A[®] (rhIFN- α 2b), por Schering-Plough. Actualmente, estos IFNs y sus variantes modificadas mediante la adición de polietilenglicol (PEG Intron[®], Schering-Plough, y PEGASYS[®], Hoffman La Roche, Inc.) se encuentran aprobados en un gran número de países para su uso clínico en el tratamiento de una amplia variedad de patologías virales y cancerígenas.

El IFN- α presenta un rol crucial en la inmunidad tumoral y terapias inmunes. Básicamente, el empleo de IFN- α 2 como agente antitumoral se basa en su elevada capacidad para ejercer citotoxicidad directa sobre células tumorales y para estimular la acción de macrófagos y células NK (Rachmawati y col., 2004). Por otra parte, el IFN- α puede ser empleado como adyuvante en protocolos de radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia contra el cáncer, permitiendo prolongar la respuesta antitumoral. Particularmente, en estos casos actúa mediante la inducción de la cascada de señalización de los IFN-I en células malignas o tumorales (Zitvogel y col., 2015). En la actualidad, el IFN- α se encuentra aprobado para el tratamiento de linfoma folicular, leucemia de células vellosas, melanoma maligno, sarcoma de Kaposi relacionada al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y carcinoma de células renales metastásico. Además, el IFN ha sido empleado frente a cáncer renal y de vejiga y como adyuvante de otros terapéuticos (Fuertes y col., 2013; El-Baky y Redwan, 2015).

Por otra parte, la terapia con IFN- α ha logrado un notable éxito en el control de infecciones con el virus de la hepatitis B y C (HBV y HCV, respectivamente). En el primer caso, la actividad viral inhibe el sistema de IFN del huésped. En consecuencia, la administración de IFN- α resulta ser una terapia de reemplazo. En el segundo caso, la infección con HCV en el 50-70% de los casos resulta en hepatitis C crónica y, generalmente, progresa hacia la aparición de cirrosis y carcinoma hepatocelular. El tratamiento con IFN- α permite reducir significativamente los niveles de ARN del HCV (observado en biopsias de hígado). Recientemente ha sido recomendado su empleo en el tratamiento de pacientes con esclerosis múltiple, quienes pierden la capacidad de respuesta al IFN- β debido a la aparición de anticuerpos neutralizantes (Fuertes y col., 2013; El-Baky y Redwan, 2015).

2.10. Propiedades farmacocinéticas y efectos adversos del rhIFN- α 2

La absorción de los IFN-I a través del tracto gastrointestinal es muy baja, motivo por el cual deben ser administrados por vía parenteral. Si bien el hIFN- α 2 puede ser administrado por vía subcutánea, intravenosa e intramuscular, la primera es la más utilizada (George y col., 2012).

A pesar de que el perfil farmacocinético del IFN depende de la vía de administración, en todos los casos se produce una rápida inactivación y eliminación de la citoquina del organismo. El riñón es el principal órgano donde se produce el catabolismo del IFN mediante filtración glomerular y reabsorción tubular, en la que ocurre la degradación proteolítica (Bino y col., 1982; Sotoca Momblona, 1999). Por este motivo, se requieren dosis elevadas y frecuentes para alcanzar la ventana terapéutica durante el tratamiento con IFN. Esto puede conducir a la aparición de efectos tóxicos y síntomas adversos al tratamiento. Uno de los efectos adversos más comunes es la linfopenia que se caracteriza por una inhibición directa sobre la producción, proliferación y recirculación de linfocitos y se revierte cuando cesa el tratamiento. Asimismo, es muy común la aparición de efectos característicos de la gripe tales como: dolor de cabeza, malestar general, fiebre, escalofríos, fatiga, mialgia y dolores en las articulaciones y espalda. También se han reportado algunos efectos psicológicos como depresión, irritabilidad y cambios en la personalidad.

Se ha demostrado que el empleo de dosis elevadas de IFN permite llevar a cabo el tratamiento de enfermedades virales y tumorales con eficacia. Sin embargo, los pacientes no son capaces de tolerar los efectos adversos que provocan (Pestka y col., 2007).

Por otra parte, el rhIFN- α 2 puede ser inmunogénico en algunos pacientes, generando anticuerpos neutralizantes que raramente han sido asociados con su toxicidad, aunque podrían ser responsables del fracaso terapéutico de la citoquina durante el curso de tratamientos crónicos. Por último, aproximadamente un 2% de los pacientes presentan reacciones adversas graves como enfermedades autoinmunes (psoriasis, artritis reumatoidea) y fallos renales o cardíacos agudos (Gutterman, 1994; Bekisz, 2004).

3. Glicosilación

Más de dos tercios de los bioterapéuticos empleados en la actualidad constituyen proteínas recombinantes glicosiladas, en las cuales los glicanos presentan roles importantes que influyen sus propiedades terapéuticas. Las características glicosídicas de cada proteína recombinante pueden variar significativamente dependiendo de la especie, el tipo celular y las condiciones fisiológicas del huésped de producción. El número y composición de glicanos presentes en una glicoproteína influyen en el reconocimiento, señalización e interacción ya sea a nivel subcelular como así también entre células y proteínas. A su vez,

presentan un rol importante en el plegamiento de la proteína y en la conformación final de la misma (Dicker y Strasser, 2015).

Las estructuras glicosídicas afectan notablemente las propiedades farmacológicas de la proteína, incluyendo su actividad, solubilidad, biodisponibilidad, farmacocinética e inmunogenicidad. Por este motivo la glicosilación debe ser controlada durante el proceso de producción a los fines de obtener bioterapéuticos eficaces (Li y d'Anjou, 2009; Dicker y Strasser, 2015).

La glicosilación constituye el proceso co/postraduccional más importante que realizan las células eucariotas. Consiste en la adición covalente de cadenas laterales de oligosacáridos a un determinado aminoácido presente en la secuencia peptídica. La biosíntesis de los glicanos ocurre en el retículo endoplasmático (RE) y en el aparato de Golgi e involucra la actividad de una gran cantidad de enzimas de membrana denominadas glicosiltransferasas y glicosidasas. En humanos existen dos tipos predominantes de glicosilación que se diferencian no sólo en el aminoácido al cual se unen, sino también en cuanto a su estructura (Li y d'Anjou, 2009; Solá y Griebenow, 2010; Costa y col., 2014).

3.1. Glicosilación tipo N

El tipo de glicosilación más prominente y mejor caracterizada es la que involucra la unión de un glicano al átomo de N del grupo amida presente en la cadena lateral de una Asn. La glicosilación tipo N comienza en el lumen del RE mediante la transferencia de un oligosacárido precursor conservado preensamblado a la Asn de la secuencia consenso Asn-Xxx-Ser/Thr (donde Xxx debe ser diferente de Pro) presente en la cadena polipeptídica naciente (Dicker y Strasser, 2015).

Específicamente, el precursor de glicanos consiste en el lípido dolicol fosfato (Dol-P) unido a 14 monosacáridos (glucosa₃manosa₉N-acetilglucosamina₂ o Glc₃Man₉GlcNAc₂) que se encuentra conservado en eucariotas. Su síntesis se lleva a cabo en el lado citosólico de la membrana del RE y comienza mediante la unión a 2 GlcNAc y 5 Man. Este último, denominado Man₅GlcNAc₂-Dol, se transloca hacia el lumen del RE, donde se adicionan 4 Man y 3 Glc para así completar la síntesis del precursor. Posteriormente, el mismo será transferido específicamente a la Asn correspondiente debido a la acción de un complejo de proteínas de membrana denominado oligosacariltransferasa (OST) (Fig. 7a) (Costa y col., 2014; Dicker y Strasser, 2015).

El precursor ya unido a la proteína sufre algunas modificaciones en el lumen del RE, que son características de las células eucariotas y se encuentran conservadas. Inicialmente las glicosidasas I y II remueven los 3 residuos de Glc terminales de manera secuencial para obtener Man₉GlcNAc₂. Este procedimiento está relacionado al plegamiento

de la proteína y permite retenerla en el RE. Posteriormente actúa una endomanosidasa que permite generar la estructura $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$. De este modo, la glicoproteína de secreción en su conformación nativa es liberada del RE y se dirige al cis-Golgi. Allí, los N-glicanos sufren una serie de procesamientos que son llevados a cabo por α -manosidasas de tipo I que actúan específicamente sobre residuos de Man con enlaces $\alpha 1,2$. Este procesamiento generalmente resulta en el glicano $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, que constituye el sustrato para su diversificación en el Golgi (Fig. 7b) (Costa y col., 2014; Dicker y Strasser, 2015).

La diversificación de la estructura glicosídica $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ permitirá obtener diferentes tipos de N-glicanos, que se caracterizan por presentar el mismo *core* formado por 2 residuos de GlcNAc y 3 residuos de Man. Este procedimiento comienza con la adición de una GlcNAc en enlace $\beta 1,2$, catalizada por la enzima GlcNAc transferasa I. Seguidamente la enzima α -Manosidasa II conduce a la remoción de una Man en unión $\alpha 1,3$ y de otra en unión $\alpha 1,6$. De este modo, se obtiene la estructura $\text{GlcNAc}_1\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. La acción de la GlcNAc transferasas II, III y IV conduce a la adición de residuos de GlcNAc. Estos residuos pueden ser extendidos mediante el agregado de galactosa (Gal) y ácido siálico (AS), para lo cual participan enzimas galactosiltransferasas y sialiltransferasas (Fig. 7c).

Existen tres tipos de N-glicanos: alta manosa, híbrido y complejo (Fig. 8a). La primera clasificación se caracteriza por presentar entre 2 y 6 residuos de Man adicionales unidas al *core*. El tipo complejo no posee manosas adicionales y presenta 2 o más ramas conteniendo GlcNAc (unidas al *core*), Gal y AS. El tipo híbrido posee una rama de tipo alta manosa y una rama de tipo compleja. Tanto los N-glicanos tipo híbrido como complejos pueden ser bi-, tri- o tetra-antenarios, de acuerdo al número de ramas que posean. Además, los tres tipos de N-glicanos comparten el mismo *core*. La adición de un residuo GlcNAc directamente a la Man central del *core* constituye la estructura GlcNAc bisectante (Fig. 7c) (Butler, 2004; Costa y col., 2014; Dicker y Strasser, 2015).

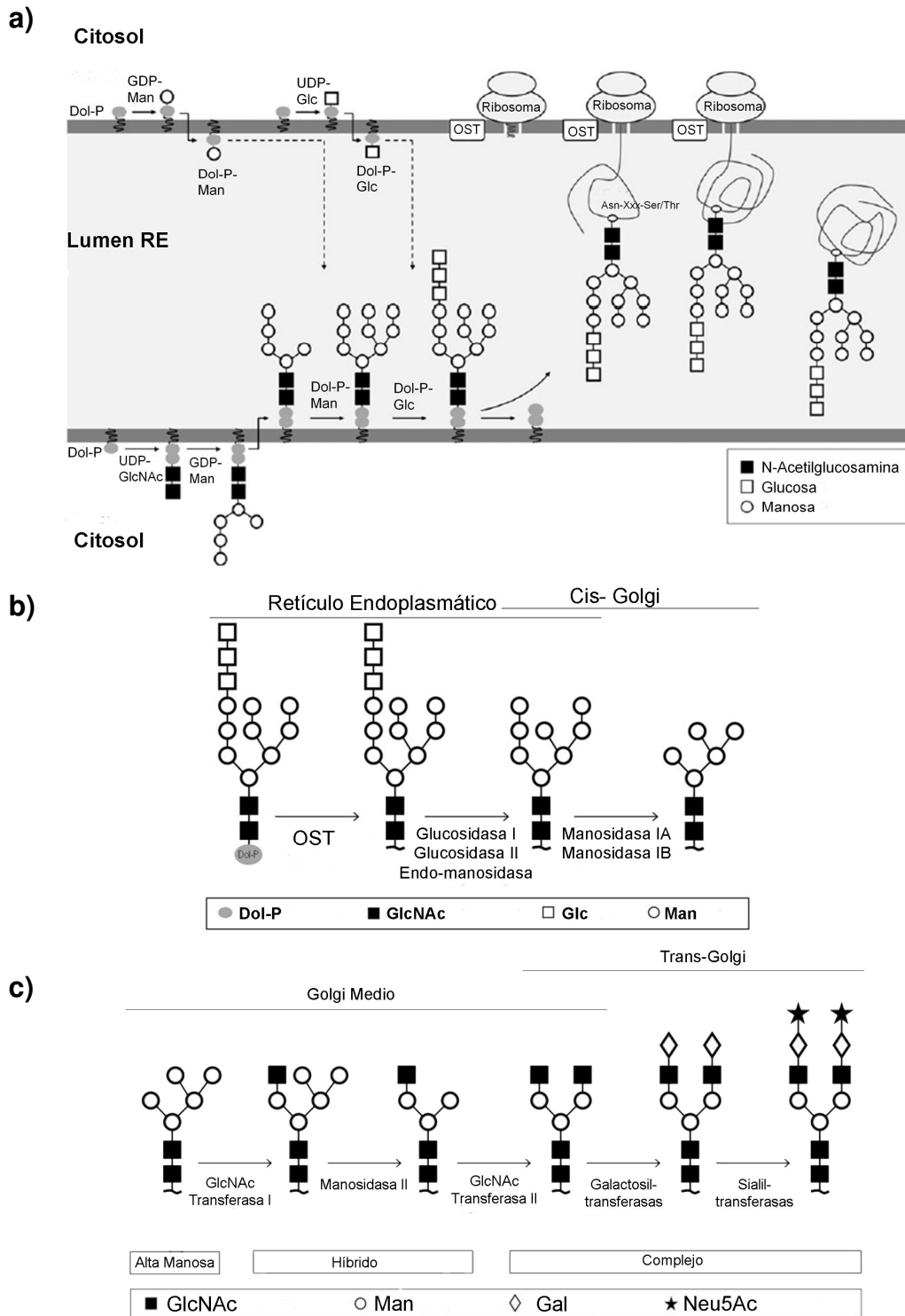


Fig. 7. a) Biosíntesis del precursor de N-glicanos Dol-P y transferencia de la cadena hidrocarbonada al residuo de Asn de la secuencia consenso (Asn-Xxx-Ser/Thr) presente en la proteína naciente.

El precursor de glicanos $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ es sintetizado en el RE y luego transferido desde Dol-P a la Asn ubicada en la secuencia consenso de la proteína naciente.

b) Procesamiento inicial en el retículo endoplasmático y Cis-Golgi

c) Representación de la diversificación de los N-glicanos en el Golgi.

Complejo oligosacariltransferasa (OST). Dolicol fosfato (DolP). Guanosina difosfato (GDP). Uridina difosfato (UDP). Manosa (Man). Glucosa (Glc). N-acetilglucosamina (GlcNAc). Retículo endoplasmático (RE) (adaptado de Costa y col., 2013).

3.2. Glucosilación tipo O

La O-glicosilación es un evento postraduccional complejo que se inicia mediante la adición de un solo monosacárido, generalmente N-acetilgalactosamina (GalNAc), al átomo de O de la cadena lateral de una Ser o Thr apropiada. No se ha identificado ninguna secuencia consenso, sin embargo, los residuos mencionados se glicosilan cuando están presentes en un entorno que contiene una alta proporción de Ser, Thr y Pro. En general, el residuo Thr se glicosila más eficientemente que Ser. Además, la O-glicosilación ocurre sobre la proteína completamente plegada y ensamblada, por lo que sólo los aminoácidos que queden expuestos podrán glicosilarse. Este proceso generalmente se inicia en el aparato de Golgi donde a partir de la GalNAc se adicionan otros monosacáridos que permiten elongar la cadena hidrocarbonada y así dar lugar a diferentes estructuras o *core*. Se han identificado 8 de las estructuras mencionadas que pueden ser modificadas mediante adición de AS, fucosa (Fuc), extensiones lactosamina (LacNAc) o bien mediante sulfatación y/o acetilación (Fig. 8b) (Rudd y Dwek, 1997; Van den Steen y col., 1998; Restelli y Butler, 2002; Peter-Katalinić, 2005).

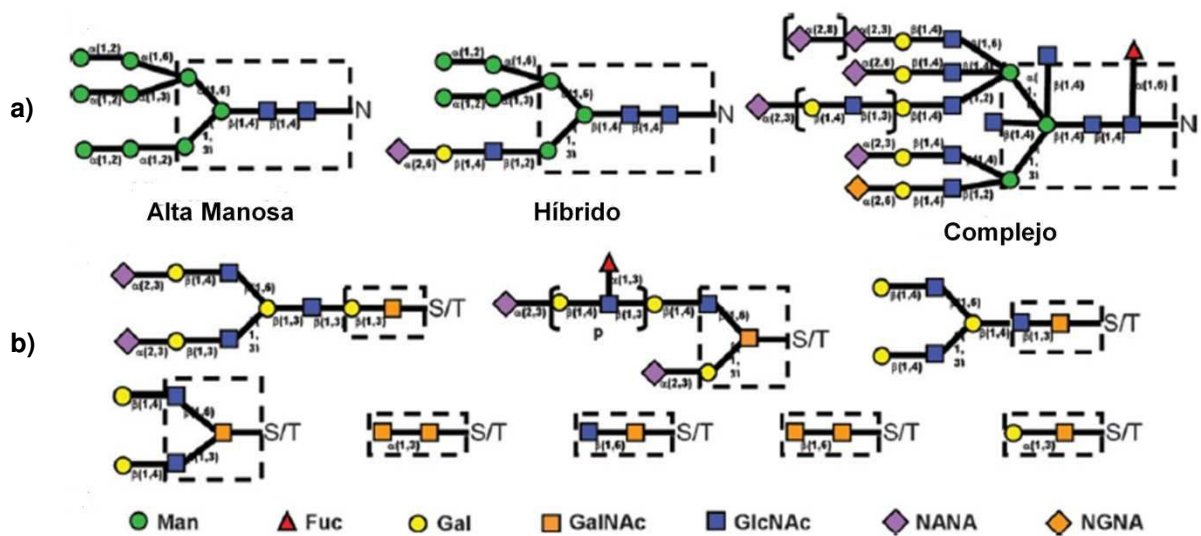


Fig. 8 Estructuras representativas de los N-glicanos (a) y O-glicanos (b)

a) Estructuras representativas de los tres tipos de N-glicanos: alta manosa, híbrido y complejo.

b) Estructuras representativas de los 8 *cores* correspondientes a O-glicanos.

Las abreviaturas indican los monosacáridos comúnmente observados para los N- y O-glicanos presentes en células de mamífero. Man (Manosa), Fuc (Fucosa), GalNAc (N-acetilgalactosamina), GlcNAc (N-acetilglucosamina), NANA (ácido N-acetilneuramínico) y NGNA (ácido N-glicolilneuramínico) (adaptado de Hossler y col., 2009).

3.3. Factores externos que influyen en la glicosilación de proteínas

El control del proceso de producción de una glicoproteína, desde el huésped de producción hasta las condiciones de cultivo, es fundamental a los fines de obtener un producto cuyas características glicosídicas sean las deseadas y demuestren consistencia. Sin embargo, el conjunto de estructuras de glicanos unidos a la proteína puede evidenciar no sólo macroheterogeneidad, asociada al grado de ocupación de los sitios potenciales de glicosilación, sino también microheterogeneidad, que se encuentra relacionada con la estructura de los glicanos presentes en cada sitio (Butler, 2005).

3.3.1. Tipo celular y factores específicos de especie

La elección del huésped de producción presenta un profundo impacto en la productividad máxima del producto y su calidad. Como se mencionara con anterioridad, existe una gran diversidad de sistemas de expresión, entre ellos: bacterias, levaduras, células de insectos, plantas y células de mamífero. Sin embargo, la elección del huésped dependerá de la aplicación que se le quiera dar al producto. Algunas proteínas terapéuticas no requieren de la glicosilación para ser eficaces. Sin embargo, la mayoría de los bioterapéuticos aprobados en la actualidad constituyen glicoproteínas que requieren de un apropiado grado de glicosilación para alcanzar su actividad biológica óptima. En este caso, la elección del sistema de expresión es crucial ya que la presencia de glicoformas de origen no humano podría ejercer efectos adversos durante el tratamiento, no resultando seguro el empleo de la proteína recombinante (Costa y col. 2014). Particularmente, en el caso de la N-glicosilación, el *core* se encuentra conservado en diferentes organismos. Sin embargo, las diferencias entre especies se dan durante los últimos pasos de la síntesis que implican su diversificación.

3.3.2. Factores ambientales y condiciones de cultivo

Diversos parámetros del cultivo pueden ser manipulados durante la producción del bioterapéutico a los fines de optimizar el crecimiento celular y la productividad volumétrica. Sin embargo, es importante tener en cuenta que los cambios introducidos pueden conducir a variaciones en las características glicosídicas del producto final (Butler, 2004; Costa y col., 2014). Los parámetros pueden ser divididos en tres categorías: medios de cultivo y nutrientes, condiciones de cultivo y plataformas tecnológicas o sistemas de cultivo:

- El medio de cultivo determina el crecimiento celular que a su vez tendrá una gran influencia en la calidad del producto final (Zhu, 2012). El medio de cultivo para células animales generalmente está constituido por una mezcla de componentes químicamente definidos e indefinidos. La glucosa es la mayor fuente de energía y el crecimiento celular en condiciones limitantes de glucosa conduce a la síntesis de glicoproteínas con ciertas

anormalidades. La glutamina es otra fuente de energía y precursor esencial de la síntesis de nucleótidos. Sin embargo, conduce a la acumulación de amonio en el medio de cultivo, que afecta el crecimiento celular y la glicosilación de proteínas; principalmente disminuye la incorporación de AS terminal. La suplementación de los medios basales con suero animal es esencial para el crecimiento y proliferación celular, pero ofrece ciertas desventajas para el proceso de producción de biofármacos, entre las cuales podemos mencionar la variabilidad entre lotes, dificultades en los procesos de purificación, elevados costos y riesgos de transmisión de enfermedades de animales a humanos. Los cultivos conteniendo suero pueden ser adaptados al crecimiento en medio libre de dicho suplemento, haciendo el proceso más económico y seguro. Sin embargo, el proceso de adaptación puede impactar no sólo en la productividad de la proteína sino también en su grado de glicosilación (Butler, 2004; Costa y col., 2014).

- Las condiciones de cultivo que permiten llevar adelante la producción a gran escala deben ser optimizadas a los fines de maximizar la productividad de la proteína recombinante. Sin embargo, cambios en parámetros como O₂ disuelto, temperatura, pH y CO₂ pueden afectar el grado de glicosilación de las proteínas. El O₂ presenta un rol importante en el metabolismo y viabilidad celular. El O₂ disuelto influye el proceso de glicosilación de un modo que resulta ser dependiente de la línea celular y específico de cada proteína. Particularmente, influye sobre la galactosilación y la sialidación. El pH también afecta la incorporación de Gal y AS y puede tener cierta influencia sobre el grado de ocupación de los sitios potenciales de glicosilación. El CO₂ debe ser considerado ya que contribuye a mantener en equilibrio el pH del medio. La reducción de la temperatura del cultivo de 37 °C a valores inferiores ha permitido incrementar la productividad de los cultivos y ésto, en algunos casos, produce cambios en los niveles de sialidación de las proteínas (Butler, 2004; Costa y col., 2014).

- Las plataformas tecnológicas de cultivo más empleadas son: *batch*, *fed-batch* y perfusión. En el primer caso, los nutrientes se van agotando, de este modo, las condiciones de cultivo cambian, lo cual puede llevar a modificaciones en el patrón de glicosilación del producto que se va acumulando en el cultivo. Por otra parte, en modo *fed-batch*, los niveles de nutrientes se encuentran controlados permitiendo el incremento de la densidad celular. El producto se va acumulando y puede sufrir cambios a niveles de glicosilación debido a la presencia de enzimas secretadas por las células o liberadas como consecuencia de su lisis. El modo perfusión se caracteriza por disminuir los tiempos de residencia de la glicoproteína en el reactor, lo cual conduce a una disminución de la heterogeneidad de las glicofomas; en general la renovación continua del medio permite obtener productos de mejor calidad. Por otra parte, la producción también puede llevarse a cabo en condiciones de adherencia. Sin

embargo, en muchos casos se prefiere la adaptación del cultivo a suspensión (Butler, 2004; Costa y col., 2014).

3.4. Impacto de la glicosilación sobre las propiedades farmacológicas de proteínas terapéuticas

Los glicanos son capaces de proveer ciertas propiedades a las proteínas. Si bien la función biológica de las mismas está definida por su componente aminoacídico, los carbohidratos determinan sus propiedades farmacológicas (Li y d'Anjou, 2009).

3.4.1 Integridad

Los glicanos presentan un rol importante en el establecimiento y mantenimiento de la integridad de las glicoproteínas. El tamaño y la masa molecular de una proteína se ven afectados por el número y tipo de glicanos unidos. Los glicanos pueden incrementar la estabilidad térmica, inhibir la agregación y mejorar su solubilidad, mediante el enmascaramiento de residuos hidrofóbicos ubicados en la superficie de la proteína. Además, los hidratos de carbono proveen protección contra la proteólisis mediante el encubrimiento de sitios de clivaje que podrían ser reconocidos por proteasas. Teniendo en cuenta estas funciones es lógico pensar que la glicosilación presente un rol importante en la modulación de la interacción entre proteínas (Imperiali y O'Connor, 1999; Sinclair y Elliott, 2005; Li y d'Anjou, 2009). La carga de la proteína se ve influenciada por la presencia de AS y está relacionada con la solubilidad de la proteína y con la resistencia a proteólisis (Costa y col., 2014).

3.4.2 Farmacocinética y farmacodinamia

Por un lado, la farmacocinética se ocupa de aquellos procesos que afectan el paso de un fármaco por el organismo: desde su liberación, absorción, distribución, metabolización hasta su excreción. Asimismo, evalúa el tiempo inicial requerido para evidenciar una respuesta y la duración de la misma. Por este motivo, los parámetros farmacocinéticos más comúnmente calculados son: el tiempo de vida media, el *clearance* o velocidad de depuración plasmática, el área bajo la curva, la concentración máxima y el tiempo requerido para alcanzarla. Por otro lado, la farmacodinamia estudia los mecanismos de acción de las drogas y sus efectos bioquímicos y fisiológicos. Tanto la farmacocinética como la farmacodinamia se ven influenciadas por los oligosacáridos que conforman las glicoproteínas y resultan críticos para la determinación de la eficacia de una proteína terapéutica (Takeuchi y col., 1990; Solá y Griebenow, 2010).

Existen diferentes mecanismos responsables de la eliminación de las glicoproteínas del torrente sanguíneo y, generalmente, involucran la participación de receptores de alta

afinidad que reconocen los azúcares terminales. Las proteínas que carecen de AS son removidas de la circulación mediante endocitosis mediada por receptores hepáticos de asialoglicoproteínas. Estos receptores son incapaces de reconocer a la proteína modificada por residuos de AS por lo que permiten depurar moléculas que presentan Gal o GalNAc como azúcares terminales. También existen receptores de Man que permiten depurar proteínas con alto contenido de dicho monosacárido, así como también receptores de tipo lectinas que permiten remover proteínas que portan Fuc y GlcNAc como monosacárido terminal (Cumming, 1991; Solá y Griebenow, 2010).

El mecanismo de filtración glomerular permite remover de circulación aquellas proteínas que presentan un tamaño menor que 70 kDa. Por ello, la velocidad de filtración depende directamente de la estructura terciaria/cuaternaria de la proteína y de su masa molecular (que determinan su forma, su tamaño y definen un radio hidrodinámico) y, además, es inhibida por la presencia de cargas negativas en la superficie. En glicoproteínas de baja masa molecular, los oligosacáridos pueden prolongar la vida media en circulación a través del aumento del tamaño y de la carga superficial negativa que aportan los AS terminales a pH fisiológico (Goochee y col., 1992; Baenziger, 1996).

3.4.3. Unión al receptor y actividad biológica

In vitro, la glicosilación permite modular la interacción de una proteína con su ligando o receptor. Si bien en algunos casos la ausencia de oligosacáridos produce un aumento de la actividad biológica específica *in vitro*, en otros, la carencia de azúcares produce una disminución de actividad (Varki, 1993).

In vivo, el incremento del grado de glicosilación y en consecuencia del contenido de AS contribuye a mejorar las propiedades farmacocinéticas de las proteínas y, por ende, su actividad biológica por los mecanismos anteriormente mencionados (Solá y Griebenow, 2010).

3.4.4 Inmunogenicidad

La glicosilación puede contribuir a modificar las propiedades inmunogénicas de una proteína favoreciendo la respuesta inmune debido a la presencia de estructuras glicosídicas inmunogénicas o por facilitar la presentación antigénica. Es decir, algunas cadenas de oligosacáridos pueden ser antigénicas por sí mismas y generar anticuerpos anti-carbohidratos, mientras que otras necesitan del entorno proteico para ser reconocidas (Lisowska, 2002; Li y d'Anjou, 2009). La generación de anticuerpos neutralizantes específicos en contra de una proteína recombinante terapéutica generalmente puede conducir a la pérdida de eficacia del tratamiento (Solá y Griebenow, 2010).

Por otro lado, la presencia de oligosacáridos puede tener un comportamiento completamente diferente, disminuyendo la respuesta inmune mediante el enmascaramiento de epitopes antigénicos.

Por lo tanto, la correcta elección del huésped para producir proteínas recombinantes de interés terapéutico es un factor de vital importancia para que las mismas presenten las modificaciones postraduccionales apropiadas. De este modo, se reduce el riesgo de que resulten antigénicas con el consecuente desarrollo de respuesta inmune humoral durante el tratamiento.

4. Ingeniería de proteínas

Inicialmente, las versiones recombinantes de proteínas naturales permitieron reemplazar proteínas deficientes o anormales. Sin embargo, esta primera generación de proteínas terapéuticas no resultó óptima para el tratamiento de las patologías asociadas. Por este motivo, se desarrolló la segunda y tercera generación de proteínas recombinantes terapéuticas mediante la incorporación de ciertas modificaciones en la secuencia proteica que permitieron mejorar los atributos del producto o las características del proceso (Kimchi-Sarfaty y col., 2013).

La ingeniería de proteínas provee las herramientas necesarias para el mejoramiento de las propiedades fisicoquímicas y biológicas de las proteínas terapéuticas. Las modificaciones introducidas pueden alterar el mecanismo de acción, efectos adversos y eficacia terapéutica de la proteína así como también satisfacer limitaciones prácticas como los costos de producción y la frecuencia de dosificación (Marshall y col., 2003).

En la actualidad existen diversas estrategias que permiten modular propiedades de las proteínas como su eficacia, especificidad, estabilidad y farmacocinética. Entre ellas es posible mencionar la fusión genética o química de la proteína terapéutica a otra proteína o a un polímero, introducción de una o varias mutaciones en la secuencia primaria o modificación de su código genético para la optimización de codones. Las dos primeras implican un cambio en la estructura primaria de la proteína (Marshall y col., 2003; Kimchi-Sarfaty y col., 2013).

Particularmente, para el caso del IFN- α se ha reportado el desarrollo del IFN- α consenso (consensus interferon, INFERGEN[®]). Esta citoquina de segunda generación constituye un IFN-I completamente sintético, desarrollado mediante comparación aminoacídica de diferentes subtipos no alélicos de IFN- α y posterior asignación de cada posición con el aminoácido más frecuentemente observado. Esta secuencia común o consenso permitió obtener una proteína con actividad biológica antiviral mejorada, motivo por el cual ha sido empleada para el tratamiento de infecciones crónicas con el virus de la hepatitis C (Blatt y col., 1996; Witthöft, 2008).

4.1. Tecnologías aplicadas al mejoramiento de la farmacocinética y farmacodinamia de proteínas terapéuticas

4.1.1. Proteínas de fusión

Las tecnologías de fusión de proteínas explotan las propiedades de ciertos dominios o módulos activos de las proteínas y manipulan su tamaño molecular mediante la fusión a otra proteína, para generar nuevas entidades moleculares con propiedades deseables. De este modo se pueden fusionar 2 o más genes que codifiquen para 2 o más proteínas diferentes, obteniéndose una proteína de fusión recombinante a partir de una única cadena de ADNc. La proteína que se elige para la fusión será la encargada de proveer la capacidad de permanecer en circulación durante un tiempo prolongado, mientras que la proteína de interés será la responsable de ejercer la acción terapéutica. Para poder aplicar esta tecnología es importante considerar que la modificación en el extremo N- o C-terminal de la proteína terapéutica no afecte su funcionalidad (Rachmawati y col., 2004; Beals y Shanafelt, 2006).

La mayoría de las plataformas tecnológicas emplean para la fusión proteínas que se caracterizan por presentar un prolongado tiempo de vida media en circulación. Entre ellas podemos mencionar: las regiones Fc de los anticuerpos (Capon y col., 1989; Beals y Shanafelt, 2006; Czajkowsky y col., 2012, Strohl, 2015), albúmina sérica (Osborn y col., 2002; Joung y col., 2009; Strohl, 2015) y transferrina (Bai y col., 2005; Subramanian y col., 2007; Amet y col., 2010; Nelson y col., 2010). De este modo, el incremento del tamaño de la proteína permite disminuir la depuración renal. A su vez, el Fc de los anticuerpos así como también la albúmina sérica humana se encuentran protegidos de la degradación mediante un proceso de reciclado dependiente de pH llevado a cabo por el receptor neonatal de Fc. Por otra parte, el receptor de transferrina dependiente de clatrina permite prolongar la vida media de proteínas de fusión a transferrina (Marshall y col., 2003; Rachmawati y col., 2004; Beals y Shanafelt, 2006; Carter, 2011; Kimchi-Sarfaty y col., 2013; Strohl, 2015).

Las propiedades farmacocinéticas del bioterapéutico de interés también pueden ser mejoradas mediante su fusión a péptidos con sitios potenciales para N- y/o O-glicosilación. En este caso, la glicosilación es la principal responsable de las mejoras alcanzadas. Estos péptidos pueden ser naturales, derivados de alguna glicoproteína, o bien sintéticos, diseñados especialmente para contener varios sitios potenciales de glicosilación.

El péptido denominado CTP (*carboxy-terminal peptide*) posee 28 aminoácidos y proviene del extremo C-terminal de la subunidad β de la gonadotropina coriónica humana o hCG. Este péptido provee 4 sitios potenciales para O-glicosilación y fue evaluado en el extremo N- y C-terminal de diferentes proteínas terapéuticas como hEPO (Lee y col., 2006; Fares y col., 2007; Fares y col., 2011), hFSH (Klein y col., 2002; Klein y col., 2003), hGH

(hormona de crecimiento humana; Fares y col., 2010), hIFN- α 2b (Ceaglio y col., 2016), hIFN- β , FIX y FVIIa de la cascada de coagulación sanguínea (Strohl, 2015). En particular, el terapéutico resultante de la fusión entre la FSH y CTP (ELONVA[®], MSD) fue aprobado por EMA para tratamientos de fertilidad en mujeres. En general, la fusión del CTP a las proteínas mencionadas resultó en la prolongación del tiempo de vida media plasmático al menos entre 2 y 4 veces, por lo que ha demostrado ser una opción válida para mejorar las propiedades farmacocinéticas de proteínas terapéuticas (Strohl, 2015).

Por otra parte, las características de la trombopoyetina humana (hTPO) condujeron al diseño de un péptido natural N-glicosilado. Particularmente, hTPO es una citoquina que actúa de forma análoga a la EPO en la eritropoyesis. Presenta un extremo C-terminal (denominado TpC) que se caracteriza por la abundancia de residuos hidrofóbicos que conforman 6 sitios potenciales para N-glicosilación. El péptido TpC posee 178 aminoácidos y fue fusionado a la EPO permitiendo incrementar considerablemente su tiempo de vida media plasmática, lo cual resultó en un incremento de su actividad hematopoyética *in vivo* (Lee y col., 2006).

Se han descrito diversos péptidos sintéticos con sitios potenciales para N-glicosilación, capaces de producir mejoras en las propiedades farmacocinéticas de las proteínas a las cuales son fusionados. Para este trabajo de tesis resultó de gran interés el péptido ANITVNITV descrito por Perlman y colaboradores (Perlman y col., 2003; Kaup y col., 2011). El péptido mencionado posee dos sitios potenciales para N-glicosilación. Su fusión a la FSH permitió incrementar la masa molecular, la carga negativa de la molécula y modificar sus propiedades hidrodinámicas que, en consecuencia, mejoraron las propiedades farmacocinéticas de la hormona, resultando en un marcado incremento de su potencia *in vivo*.

Recientemente, se han utilizado con éxito polipéptidos sintéticos recombinantes no estructurados llamados XTEN que permitieron extender la vida media plasmática de diversas proteínas. Las secuencias aminoácidas XTEN no poseen sitios potenciales para glicosilación pero permiten mejorar las propiedades farmacocinéticas debido a su tamaño. Están formadas por los aminoácidos Ala, Glu, Gly, Pro, Ser y Thr y presentan longitudes entre 288 (32 kDa) y 1008 (111 kDa) residuos. Actualmente se conocen 9 proteínas de fusión a XTEN: hGH, exedin, glucagon, IL-1ra, rFVIIa, rFVIII, rFIX, GLP-1 y GLP-2. La mayoría de ellas se encuentran en distintas fases de los ensayos clínicos (Schellenberger y col., 2009; Strohl, 2015).

En términos generales, las proteínas de fusión descritas se caracterizan por presentar actividad biológica *in vitro* disminuida respecto del componente activo sin fusionar (Zhao y col., 2008; Chen y col., 2013). Esto puede deberse a una dificultad de unión a su receptor celular causada por el impedimento estérico que puede provocar la proteína

fusionada. El empleo de *linkers* con diferentes estructuras y longitudes, así como también su fusión al extremo N- o C-terminal puede tener una gran influencia sobre la actividad *in vitro* de la proteína (Strohl, 2015).

4.1.2. Conjugación a polímeros

La conjugación de la proteína terapéutica de interés a un polímero permite prolongar su vida media plasmática mediante el incremento del volumen hidrodinámico que resulta en una disminución de su velocidad de eliminación. Además, las cadenas de polímeros pueden proteger a la proteína del reconocimiento por parte de anticuerpos neutralizantes y de la acción de enzimas proteolíticas, gracias a que generan impedimento estérico. Este tipo de modificación también permite incrementar la solubilidad en agua y prevenir o reducir la agregación, la antigenicidad e inmunogenicidad de las proteínas (Pasut y Veronese, 2007).

Un polímero ideal para la conjugación a proteínas terapéuticas es el PEG que resultó ser el más utilizado por la industria farmacéutica (Pasut y Veronese, 2007). El procedimiento de conjugación de PEG a una determinada droga a través de sus grupos reactivos es conocido como PEGilación. Dependiendo del sistema de activación de la molécula de PEG, los sitios seleccionados para la conjugación a polipéptidos pueden ser: Lys, Cys, His, Arg, Asp, Glu, Ser, Thr, Tyr o a los aminoácidos presente en los extremos N-terminal y C-terminal de proteínas. La vía más empleada de conjugación a proteínas es la activación del PEG para la posterior reacción con el grupo γ -amino de residuos de Lys (Roberts y col., 2002).

Algunos de los productos comerciales derivados del procedimiento de PEGilación son los anteriormente mencionados PEG-IFN- α 2b (PEG-INTRON[®]; Wang y col., 2002), PEG -IFN- α 2a (PEGASYS[®]; Bailon y col., 2001; Reddy y col., 2002) y otros tales como PEG-receptor antagonista de GH (PEGVISOMANT, Somavert[®], Pfizer; Trainer y col., 2000) y PEG-factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humano (PEG-GM-CSF, PEGFILGRASTIM, Neulasta[®], Amgen; Kinstler y col., 2002).

Particularmente la conjugación de PEG al IFN- α 2 se llevó a cabo empleando dos reactivos de conjugación diferentes: PEG lineal de 12 kDa y PEG ramificado de 40 kDa. Como resultado se obtuvo una notable mejoría en los parámetros farmacocinéticos demostrando tiempos de vida media entre 27-37 h y 65 h para el PEG-Intron[®] y el PEGASYS[®], respectivamente. Sin embargo, la conjugación a PEG produjo un cambio en la actividad biológica específica (ABE) *in vitro* del IFN que resultó inversamente proporcional al tamaño de la molécula de PEG. Es decir, la molécula de PEG lineal-IFN- α 2b retuvo un 28% de su actividad antiviral mientras que la molécula de PEG ramificado-IFN- α 2a conservó sólo un 6%. A pesar de este resultado, las mejoras en la propiedades farmacocinéticas de

PEGASYS fueron suficientes para lograr incrementos notables de su actividad *in vivo* (Marshall y col., 2003; Pasut y Veronese, 2007).

Una clara desventaja del empleo de esta tecnología es que generalmente provoca una pérdida de actividad biológica de la proteína debido a la apantallamiento de sitios activos que son esenciales para su acción (Marshall y col., 2003). Además, pueden aparecer efectos adversos provocados por el polímero en sí mismo o por productos secundarios formados durante la síntesis (Knop y col., 2010).

4.1.3. Glicoingeniería

El principal éxito de la glicoingeniería es lograr que las proteínas porten no sólo glicanos más definidos mediante el control o la modificación de diversas vías biosintéticas sino también mediante la remoción o incorporación de oligosacáridos. Así, por ejemplo, en el primer caso fue posible incrementar la antenaricidad de los glicanos de glicoproteínas humanas mediante la sobreexpresión de enzimas ramificantes tales como N-acetilglucosaminil-transferasas IV y V o, bien, fue posible la eliminación de la expresión de la Fuc en enlace α 1,6 al *core* de un N-glicano mediante el *knockout* de la enzima α 1,6-fucosiltransferasa (Dicker y Strasser, 2015).

Sin embargo, la glicoingeniería no sólo se basa en procedimientos para optimizar la glicosilación de una proteína o una vía de remodelar glicanos existentes; puede ser también definida como un procedimiento para incrementar el contenido de glicanos, específicamente de hidratos de carbono conteniendo AS con el fin de aumentar la actividad biológica y la duración de la acción de tales proteínas. De esto modo, tanto Elliot y col. (2003) como Sinclair y Elliot (2005), indicaron que un aspecto de la glicoingeniería es la introducción de sitios consenso de N-glicosilación en posiciones deseadas del esqueleto peptídico para generar proteínas con mayor vida media en suero. Esto fue demostrado en proteínas conteniendo sitios de N-glicosilación como EPO, proteínas que normalmente contienen sitios de O-glicosilación como el ligando de Mpl (factor de crecimiento y desarrollo de megacariocitos) y el IFN-alfa2b, y proteínas que normalmente carecen de ellos tales como la leptina (Elliot y col., 2003; Sinclair y Elliot, 2005, Ceaglio y col., 2008). De este modo, la glicoingeniería forma parte de la ingeniería de proteínas y permite generar nuevas entidades moleculares con superior carga negativa y un radio hidrodinámico aumentado. Tales características conducen a la reducción del *clearance* renal, la modulación de la endocitosis mediada por receptores y la protección de la proteína contra la degradación proteolítica.

Entre las estrategias de glicoingeniería se encuentra la conjugación química de oligosacáridos sintéticos directamente al esqueleto de la proteína. Tal es el caso de la α -glucosidasa (MYOZYME[®], Sanofi Genzyme), para la cual la conjugación de un oligosacárido conteniendo manosa-6-fosfato (M6P) en su extremo permitió incrementar la

afinidad de unión a receptores específicos de M6P responsables de desencadenar su actividad (Zhu y col., 2005; Zhu y col., 2009). Otra estrategia de glicoingeniería consiste en la introducción de mutaciones puntuales con el objetivo de generar sitios potenciales para N-glicosilación (Asn-Xxx-Ser/Thr) que posteriormente serán reconocidos y glicosilados por la maquinaria endógena celular (Sinclair y Elliott, 2005; Beals y Shanafelt, 2006; Kimchi-Sarfaty y col., 2013).

Particularmente, la implementación de las mencionadas estrategias de glicoingeniería ha permitido desarrollar nuevos bioterapéuticos disponibles en el mercado de productos biológicos. Entre ellos podemos mencionar NESP[®] (Amgen), una muteína análoga a la rhEPO que posee 5 sitios potenciales para N-glicosilación en comparación con la molécula nativa que presenta sólo 3. Esta nueva variante ofrece un tiempo de vida media en circulación cuatro veces incrementado respecto de la molécula original (Walsh, 2010; Kimchi-Sarfaty y col., 2013). Por otro lado, también se ha reportado el desarrollo de una variante hiperglicosilada de FSH (ELONVA[®]), que contiene cuatro sitios adicionales de O-glicosilación. Esta modificación le confirió una eficacia terapéutica aumentada en términos de incremento de ovulación (Trousdale y col., 2009).

Por otra parte, en nuestro laboratorio se ha desarrollado una variante hiperglicosilada del hIFN- α 2b denominada IFN4N (Ceaglio y col., 2008). La misma fue construida mediante la introducción de 4 mutaciones puntuales en la secuencia del hIFN- α 2b (P4, R23, K70, D77) que permitieron generar 4 sitios potenciales de N-glicosilación. La elección de los aminoácidos en los cuales se realizó la mutación puntual se llevó a cabo a partir de un análisis teórico basado en la estructura de la citoquina y en regiones de la misma potencialmente involucradas en la interacción con el receptor. Inicialmente, se seleccionaron 14 posibles mutaciones que permitieran generar variantes portando un sitio consenso de N-glicosilación con una alta probabilidad de glicosilación, evitando distorsión conformacional y conservando la actividad biológica de la proteína. La comparación de la eficiencia de glicosilación y la ABE de las muteínas con un sitio de N-glicosilación expresadas en forma transitoria en células CHO-K1 condujeron a la selección de las posiciones más adecuadas para incorporar, de manera secuencial, múltiples sitios de N-glicosilación hasta generar la variante IFN4N. Esta última evidenció una masa molecular aparente aproximadamente 3 veces superior en comparación con la molécula no glicosilada. Además, conservó sólo entre un 10% y un 20% de la ABE antiviral correspondiente a la proteína nativa. La introducción de mutaciones o la unión de los oligosacáridos afectaron en mayor grado la actividad biológica antiproliferativa *in vitro* de las citoquinas, observándose una notable reducción luego de la sustitución de la R23 por Asn. La molécula IFN4N conservó sólo entre un 2% y un 3% de dicha ABE. Estudios farmacocinéticos demostraron un incremento de 25 veces en el tiempo de vida media y una disminución de 20 veces en el

clearance sistémico, con respecto a la molécula no modificada (Ceaglio y col. 2008). Finalmente y a pesar del importante descenso de la ABE antiproliferativa evaluada *in vitro*, la notoria mejora de las propiedades farmacocinéticas debidas al agregado de los N-glicanos permitió incrementar la actividad biológica antitumoral *in vivo* del IFN4N. La misma fue estudiada en ratones inmunodeficientes mediante la implantación de tumores sólidos de células de origen prostático (PC-3), en los cuales se observó una disminución de la velocidad de crecimiento de los tumores por acción de la citoquina hiperglicosilada, en comparación con el mismo esquema de tratamiento empleando rhIFN- α 2b no glicosilado (Ceaglio y col., 2010a).

Estos resultados demuestran que la glicoingeniería puede ser implementada como un método efectivo para incrementar la actividad biológica *in vivo* de una gran variedad de proteínas terapéuticas y estimulan la continuidad del tema de investigación en nuestro laboratorio. Más aún, el hecho de que los derivados glicosilados exhiban una disminución de la actividad biológica *in vitro* promueve la búsqueda de nuevas estrategias para la obtención de moléculas hiperglicosiladas que superen las desventajas mencionadas y reúnan las mejores propiedades para ser consideradas como candidatos terapéuticos.

En otro aspecto, debido al grado de dificultad y el bajo rendimiento asociados a la producción de proteínas recombinantes en células animales, la exhaustiva caracterización de las variantes hiperglicosiladas del hIFN α 2b como potenciales medicamentos demanda la generación de líneas y clones celulares que presenten una elevada productividad de la citoquina. Es aquí donde adquiere relevancia la optimización del proceso productivo desde el *upstream*, incluyendo la evaluación de diferentes sistemas de alta expresión en células eucariotas, como es el caso de los vectores lentivirales de tercera generación, y el uso de huéspedes celulares de diferente origen.

OBJETIVOS



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del presente trabajo de tesis es el diseño y optimización de un proceso de producción de muteínas de hIFN- α 2b con mayor actividad biológica antiviral y antitumoral y, en consecuencia, superior eficacia terapéutica con respecto a la proteína no glicosilada, utilizando técnicas de glicoingeniería.

Se propone la optimización del proceso de *upstream* mediante el empleo de vectores lentivirales de tercera generación para la transferencia de material genético al genoma de las células huésped. De este modo, se pretende incrementar el nivel de expresión y la productividad de las variantes hiperglicosiladas de hIFN- α 2b de interés en cultivos de células eucariotas. Asimismo, se propone el empleo de células HEK293, además de células CHO-K1 como huésped de producción, a los fines de estudiar las características de una variante hiperglicosilada de hIFN- α 2b producida en células humanas.

Por otra parte, se plantea la generación de nuevas muteínas que presenten una actividad biológica *in vivo* mejorada con respecto a aquéllas obtenidas previamente en nuestro laboratorio. Para ello, se proponen dos estrategias: incremento del contenido de glúcidos con el objeto de disminuir la velocidad de depuración plasmática, factor determinante de la eficacia de la proteína e incremento de la potencia biológica *in vitro* de la citoquina, mediante la selección de mutaciones puntuales que no interfieran en la interacción con el receptor celular del hIFN- α 2b. Las moléculas así obtenidas serán caracterizadas no sólo en cuanto a su grado de glicosilación y farmacocinética sino que también se encarará el estudio de su actividad biológica *in vivo*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Tomando como base la variante glicosilada IFN4N, que contiene 4 sitios consenso de N-glicosilación en las posiciones 4, 23, 70 y 77, los objetivos propuestos son:

- 1- Optimización de la etapa de *upstream* del proceso de producción del IFN4N:
 - A) Evaluación del empleo de vectores lentivirales de tercera generación para la transferencia de material genético a las células huésped.
 - B) Obtención de clones de células CHO-K1 y HEK293 productores de IFN4N; comparación de la productividad celular y calidad de la muteína en ambas líneas celulares.
- 2- Obtención de nuevas variantes hiperglicosiladas de hIFN- α 2b:
 - A) Modificación del ADNc del IFN4N con dos propósitos: incrementar su contenido glicosídico (obtención de moléculas con 5 y 6 sitios consenso de N-glicosilación) e incrementar su actividad biológica *in vitro* (incorporación de nuevas combinaciones de 4, 5 y 6 sitios, suprimiendo la mutación R23N

presente en el IFN4N, potencial responsable de su menor actividad antiproliferativa *in vitro*).

- B) Construcción de vectores de alta expresión y utilización de los mismos en transfecciones transitorias con el fin de caracterizar las moléculas en términos de contenido glicosídico y actividad biológica antiviral y antiproliferativa *in vitro*.
 - C) Generación de líneas celulares recombinantes y obtención de clones celulares estables productores de las variantes de hIFN- α 2b seleccionadas en el inciso anterior.
- 3- Producción de las muteínas de hIFN- α 2b en una mayor escala y purificación mediante cromatografía de inmunoafinidad.
 - 4- Caracterización fisicoquímica, glicosídica y biológica *in vitro* de las muteínas de hIFN- α 2b purificadas.
 - 5- Análisis farmacocinético en ratas de las variantes hiperglicosiladas de hIFN- α 2b.
 - 6- Evaluación de la actividad biológica antitumoral *in vivo* de dichas variantes sobre carcinomas de origen prostático implantados en ratones inmunodeficientes.

Los objetivos 1 y 2 serán desarrollados en capítulos independientes de la sección Resultados y discusión, mientras que los restantes objetivos serán tratados en ambos capítulos de la presente tesis.

MATERIALES Y MÉTODOS

A horizontal line with several colored markers: a red triangle pointing left, a yellow circle, a black dot, a green circle, and a purple diamond.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos y soluciones

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

2. Líneas celulares, cepas bacterianas y cepas virales

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

La línea **CHO-K1** (Puck y col., 1958) fue obtenida de ATCC (*American Type Culture Collection*[®], EE.UU) (ATCC CCL-61). Es un clon de la línea celular CHO derivada de ovario de hámster chino adulto. Se empleó como huésped para la expresión de proteínas recombinantes. En el resto del manuscrito se hace referencia a esta línea celular con la sola denominación CHO.

La línea **HEK293T/17** fue obtenida de ATCC (ATCC CRL-11268). Es un clon que deriva de la línea celular HEK293, establecida a partir de riñón de embrión humano por Graham en 1977 (Graham y col., 1977). El clon 293T/17 fue modificado para generar la expresión del antígeno T del virus SV40. Se utilizó para el ensamblado de partículas lentivirales y como huésped para la expresión de proteínas recombinantes. En el resto del manuscrito se hace referencia a esta línea celular con la sola denominación HEK.

La línea **MDBK** (*Madin-Darby Bovine Kidney*) (Madin y Darby, 1958) fue obtenida de la Asociación Banco Argentina de Células (ABAC, Buenos Aires, Argentina). Son células bovinas derivadas de riñón de un animal adulto normal, susceptibles a la infección con el virus VSV. Se utilizaron para la valoración biológica antiviral *in vitro* del hIFN-α2b y de sus derivados hiperglicosilados.

La línea **Daudi** (Klein y col., 1968; Nadkarni y col., 1969) fue obtenida de la colección de cultivos del *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ; Braunschweig, Alemania). Es una línea celular humana derivada de linfoma de Burkitt, que se empleó para la valoración de la actividad biológica antiproliferativa *in vitro* del hIFN-α2b y de sus derivados hiperglicosilados.

La línea **PC-3** (Kaighn y col., 1979; Pan y col., 1999) fue obtenida de la colección de cultivos del DSMZ. Es una línea celular humana establecida a partir de un adenocarcinoma de próstata, capaz de formar tumores en ratones *nude*. Se empleó para evaluar la capacidad del IFN4N producido en células CHO y HEK de inhibir su proliferación *in vitro*. Además, fue empleada para la generación de un modelo de carcinoma subcutáneo en

ratones *nude*, que permitió evaluar la actividad antitumoral *in vivo* de diferentes variantes hiperglicosiladas del hIFN- α 2b.

La línea **ACHN** (Kochevar, 1990) fue obtenida de ATCC (ATCC CRL-1611™). Constituye una línea celular humana establecida a partir de un adenocarcinoma renal. Se empleó para evaluar la capacidad del IFN4N producido en células CHO y HEK de inhibir su proliferación *in vitro*.

La línea **A375** (Giard y col., 1973; Gershwin y col., 1977) fue obtenida de ATCC (ATCC CRL-1619™). Es una línea celular humana derivada de melanoma maligno. Se empleó para evaluar la capacidad del IFN4N producido en células CHO y HEK de inhibir su proliferación *in vitro*.

El **hibridoma productor del mAb anti-rhIFN- α 2b**, denominado CA5E6, fue obtenido en el Laboratorio de Cultivos Celulares (LCC) (Casalis, 2004). El mencionado mAb fue caracterizado en el LCC y evaluado para el desarrollo de ensayos inmunoquímicos y para la purificación del hIFN- α 2b y sus variantes hiperglicosiladas mediante su empleo en cromatografía de inmunoafinidad (CIA).

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

El **virus de la estomatitis vesicular (VSV)**, cepa Indiana, fue cedido gentilmente por el Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas “Dr. Julio I. Maiztegui”. Se utilizó para los ensayos de valoración biológica antiviral *in vitro* del hIFN- α 2b y de sus variantes hiperglicosiladas.

3. Medios de cultivo

3.1. Medios de cultivo para células eucariotas

La esterilización de los medios de cultivo se realizó por filtración empleando filtros estériles con un tamaño de poro de 0,22 μ m (Millipore). Para controlar la esterilidad, los medios filtrados se incubaron durante 48 h a 37 °C.

El suero fetal bovino (SFB) (PAA) empleado para la suplementación de los medios de cultivo fue previamente descomplementado por incubación en baño de agua termostático 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 D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco) y Ham's-F12 (Gibco) suplementados con NaHCO₃ (Gibco) 2,441 g.l⁻¹, glutamina (Sigma) 200 mM, sulfato de gentamicina (Gibco) 0,05 mg.ml⁻¹ y SFB en diferentes concentraciones según la experiencia (detalladas en la sección resultados y discusión). El medio

DMEM/Ham's F12 fue suplementado con el antibiótico puromicina (Sigma) en diferentes concentraciones (detalladas en la sección resultados y discusión) para llevar a cabo el procedimiento de selección de células.

HEK:

Se utilizó un medio compuesto por medio DMEM (Gibco) 13,37 g.l⁻¹, NaHCO₃ 1,5 g.l⁻¹, piruvato de sodio 0,11 g.l⁻¹, gentamicina 0,05 g.l⁻¹ y SFB 10% (V/V). El mismo fue suplementado con el antibiótico puromicina (Sigma) en diferentes concentraciones para llevar a cabo el procedimiento de selección de células.

MDBK:

Se utilizó el medio MEM (Minimum Essential Medium, Gibco) suplementado con glutamina 2 mM, NaHCO₃ 2,2g.l⁻¹, sulfato de gentamicina 0,05 mg.ml⁻¹ y SFB 10% (V/V).

Daudi:

Se empleó el medio RPMI 1640 (Roxwell Park Memorial Institute, Gibco) suplementado con glutamina 2 mM, NaHCO₃ 1,5 g.l⁻¹, sulfato de gentamicina 0,05 mg.ml⁻¹ y SFB 10% (V/V).

PC-3:

Se utilizó una mezcla 1:1 (V/V) de los medios RPMI 1640 y Ham's F12 suplementados con SFB 10% (V/V).

ACHN:

Se utilizó el mismo medio de cultivo descrito para las células MDBK.

A375:

Se empleó el medio D-MEM suplementado con NaHCO₃ 3,7 g.l⁻¹, piruvato de sodio 1 mM, sulfato de gentamicina 0,05 mg.ml⁻¹ y SFB 10% (V/V).

Hibridomas:

Se empleó el medio D-MEM suplementado con NaHCO₃ 3,7 g.l⁻¹, piruvato de sodio 1 mM, sulfato de gentamicina 0,05 mg.ml⁻¹, tylosina (Sigma) 0,06 mg.ml⁻¹ y SFB 10% (V/V).

3.2. Medios de cultivo para células procariotas

La esterilización de los medios de cultivo para bacterias se realizó en autoclave durante 15 min a 1 atm a 120 °C. El medio LB (Luria-Bertani), compuesto de triptona (Sigma) 10 g.l⁻¹, extracto de levadura (BD) 5 g.l⁻¹ y NaCl (Sigma) 10 g.l⁻¹ se empleó para el crecimiento bacteriano en medio líquido. El caldo LB suplementado con ampicilina (Bagó) 100 µg.ml⁻¹ se utilizó para el crecimiento de clones resistentes a dicho antibiótico.

El medio agar LB consistió en medio LB con el agregado de agar (Sigma) 2% (P/V). El medio agar LB suplementado con ampicilina $100 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ fue empleado para la selección de clones bacterianos. El antibiótico se suplementó al medio estéril fundido una vez que la temperatura alcanzó aproximadamente los $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$, ya que el mismo es termolábil. Luego de homogeneizar, se procedió a adicionar 15 ml del mismo en placas de Petri estériles de 90 mm de diámetro.

4. Técnicas de Biología Molecular

4.1. Digestiones enzimáticas

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

Luego de las digestiones enzimáticas, los fragmentos se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa (sección 4.2) para su posterior análisis y/o purificación.

4.2. Electroforesis en geles de agarosa

Las separaciones de ADN en geles de agarosa se realizaron empleando el sistema submarino (Sambrook y col., 1989c). Para la preparación de los geles, de concentración de agarosa variable entre 1% y 1,5% (P/V), se pesó la cantidad adecuada de agarosa (Biodynamics SRL) y se disolvió en solución reguladora TAE (Tris-Acetato 40 mM pH 8, Na_2EDTA 1 mM) en horno microondas hasta su completa solubilización. La solución se enfrió a $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 se retiró una vez solidificado. El gel se colocó en una cuba electroforética y se cubrió completamente con solución TAE.

Las muestras de ADN se mezclaron con solución de siembra 6 X [Ficoll 400 10% (P/V), azul de bromofenol 0,25% (P/V), xilencianol FF 0,25% (P/V), orange G 0,4% (P/V), Tris 10 mM, Na_2EDTA 50 mM, pH 7,5] y cuidadosamente se sembraron en cada una de las calles del gel. Se tapó la cuba y se aplicó un voltaje entre 80 y 100 V hasta observar una adecuada distancia de migración de los colorantes de la solución de siembra.

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 intercalante que se introduce en la estructura secundaria de la doble hélice del ADN y se acopla energéticamente a los ácidos nucleicos que lo forman, de manera que su tasa de emisión fluorescente se incrementa notablemente.

Este fenómeno se conoce como transferencia de energía mediante resonancia de fluorescencia. El complejo resultante ADN/SYBR presenta el pico de absorción en $\lambda=498$ nm y el pico de emisión en $\lambda=522$ nm (correspondiente a la zona verde del espectro).

Para estimar la longitud de los fragmentos de ADN separados se emplearon los marcadores de masa molecular CIEN marker (Biodynamics) y 200 bp DNA Step Ladder (Promega).

4.3. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de ADN de hasta 1000 pb fueron purificados a partir de geles de agarosa utilizando el kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La purificación se verificó analizando una alícuota mediante electroforesis en gel de agarosa.

4.4. Purificación de fragmentos de ADN a partir de una mezcla de digestión

Para separar un fragmento de ADN de interés de otros fragmentos de ADN de un tamaño menor a 100 pb a partir de una solución, se empleó el sistema PureLink™ PCR Purification kit (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit también es útil para la eliminación de oligonucleótidos cortos, desoxinucleótidos (dNTPs), polimerasas y sales de las reacciones de PCR. Por otro lado, se puede emplear para purificar fragmentos digeridos con enzimas de restricción de las mismas enzimas, sales y fragmentos de ADN residuales cortos provenientes de la digestión.

En todos los casos, se determinó la pureza y la concentración de los fragmentos mediante un gel de agarosa.

4.5. Reacciones de ligación de ADN

Para las reacciones de ligación se utilizó una relación inserto/plásmido 3:1 en un volumen de reacción de 10 μ l, utilizando la enzima T4 DNA Ligasa (Invitrogen), según el protocolo indicado por el proveedor. La mezcla de reacción se incubó durante toda la noche a 16 °C. Se realizó un control de plásmido religado, reemplazando el volumen correspondiente al inserto por agua autoclavada.

4.6. Preparación de células competentes

Para la preparación de células competentes se empleó un medio rico en nutrientes que favorece la creación de perforaciones en la pared celular bacteriana y, en consecuencia, la introducción del ADN plasmídico. La triptona y el extracto de levadura presentes en el medio de cultivo ofrecen el nitrógeno y los factores de crecimiento necesarios para la replicación bacteriana y para su recuperación luego del proceso de transformación. El

sulfato de magnesio provee los iones Mg^{2+} necesarios para la reacción enzimática que permite la replicación del ADN.

Para la preparación de bacterias competentes se realizó una estría de *E. coli* TOP 10, obtenida de un banco conservado a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, sobre una placa de agar LB. Se cultivó durante toda la noche a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se escogió al azar una de las colonias desarrolladas y se inoculó en 5 ml de medio LB, incubándose a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche con agitación a 200 rpm. El cultivo se repicó en una dilución 1:100 en 50 ml de medio B (LB suplementado con $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 10mM, glucosa 0,2% (P/V)) y se incubó a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación a 180 rpm durante 150 min. Posteriormente, las células fueron trasvasadas asépticamente a un tubo de centrífuga estéril enfriado previamente e incubadas durante 15 min en baño de hielo. Las bacterias se cosecharon mediante centrifugación a 4000 rpm durante 10 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 500 μl de medio LB frío. A esta suspensión se le adicionaron 2,5 ml de solución de conservación (medio LB conteniendo glicerol 36% (P/V), PEG 12% (P/V) (MW7500), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 12mM, esterilizado por filtración con membrana de 0,22 μm) y se mezcló suavemente. Finalmente, la suspensión celular fue dispensada en alícuotas de 100 μl en criotubos fríos y conservada a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización (Sambrook y col., 1989a).

4.7. Transformación de células competentes

Para realizar la transformación bacteriana se descongelaron 100 μl de células competentes y se mezclaron con 10 μl de la mezcla de ligación, incubando durante 30 min en baño de hielo. Posteriormente, el tubo se colocó en un baño a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 min e inmediatamente se transfirió nuevamente a hielo, incubándose durante 5 min. Se adicionaron 900 μl de medio LB y se incubó durante 60 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con agitación a 200 rpm, con el objeto de permitir la recuperación de las bacterias de la situación de estrés a la cual fueron sometidas. Las células se cosecharon mediante centrifugación a 5000 rpm durante 5 min, se descartaron 850 μl de sobrenadante y el sedimento se resuspendió en el volumen remanente de medio. Finalmente, la totalidad de la suspensión celular se distribuyó en forma homogénea sobre una placa conteniendo agar LB suplementado con ampicilina, de manera de seleccionar las bacterias transformadas, y se incubó durante toda la noche a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.8. Preparación de ADN plasmídico

4.8.1. Minipreparación

Con el fin de obtener los diferentes vectores de expresión de las variantes del hIFN- α 2b con una pureza y concentración adecuadas para realizar su secuenciación y para emplearlos en experimentos de transfección de células eucariotas, se realizó una extracción plasmídica en pequeña escala.

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

4.8.2. Maxipreparación

Con el propósito de obtener cantidades suficientes de los vectores de expresión para su empleo en experimentos de ensamblado de partículas lentivirales, se realizaron preparaciones de ADN plasmídico en gran escala (maxiprep), empleando el método de lisis alcalina descrito en Sambrook y col. (1989b).

Inicialmente se realizó una estría de la cepa conteniendo el plásmido de interés sobre una placa de agar LB y se cultivó durante toda la noche en estufa a 37 °C. Se tomó una colonia aislada y se la cultivó en 10 ml de medio LB líquido suplementado con ampicilina durante 16 h a 37 °C en agitación a 180 rpm. Se agregó a este precultivo 90 ml de medio LB con antibiótico y se mantuvo en agitación durante 8 h en las mismas condiciones. Posteriormente, se amplificó el cultivo a un frasco Erlenmeyer conteniendo 300 ml de medio LB y se incubó durante 16-20 h en las mismas condiciones.

Los cultivos se centrifugaron a 2500 g durante 10 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 10 ml de *solución I* [Tris-HCl 25 mM pH 8,3; Na₂EDTA 10 mM; glucosa 1% (V/V)], incubándose durante 5 min en hielo. Se adicionaron 20 ml de *solución II* [NaOH 0,2 N; SDS 1% (V/V)] homogeneizando adecuadamente para lograr la lisis celular en hielo durante 5 min. Se agregaron 15 ml de *solución III* o solución de neutralización [K⁺ 3 M, Ac⁻ 5 M], a 4 °C, homogeneizando. Se incubó durante 10 min en hielo y se centrifugó a 2500 g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se filtró a través de un papel de filtro y el ADN plasmídico se precipitó mediante el agregado de 0,6 volúmenes de isopropanol (Baker), incubando 15 min a -70 °C. Se centrifugó a 2500 g durante 20 min a 4 °C y el precipitado se resuspendió en 1 ml de *solución IV* [etanol 80% (V/V); Tris-HCl 10 mM pH 8; NaCl 100 mM]. La suspensión se trasvasó a un tubo cónico de 1,5 ml y se centrifugó a 13000 g durante 1 min a temperatura ambiente. El pellet se resuspendió en 1 ml de LiCl 2 M, dejando en hielo durante 1 h con el propósito de precipitar el ARN.

La solución se centrifugó 2 min a 13000 g y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo donde se realizó una extracción con fenol/cloroformo 1:1 (V/V), empleándose 250 µl de cada reactivo. Se centrifugó a 13000 g durante 2 min y se conservó la fase acuosa (superior). A la misma se le adicionó 1 volumen de isopropanol, se agitó y se incubó durante 15 min a -70 °C para precipitar el ADN. Se centrifugó a 13000 g durante 15 min a 4 °C y el

precipitado se lavó con 50 µl de *solución IV* centrifugando durante 5 min. El precipitado se disolvió en 500 µl de solución TE [Tris-HCl 25 mM pH 8,3; NaCl 100 mM] con el agregado de ARNasa (Promega) 100 µg.ml⁻¹. Se incubó 1 h a 37 °C para eliminar restos de ARN.

Se repitió la extracción fenol/cloroformo para eliminar la ARNasa adicionada. El ADN presente en la fase acuosa se precipitó mediante el agregado de 50 µl de NaAc 3 M pH 7 y 0,6 volúmenes de isopropanol, se agitó y se incubó 15 min a -70 °C, con el fin de precipitar el ADN plasmídico. Se centrifugó a 13000 g durante 15 min a 4 °C. El precipitado se lavó con 50 µl de *solución IV* y se dejó secar a 37 °C en estufa. Finalmente, se resuspendió con 300 µl de agua estéril.

Posteriormente, se evaluó la integridad de los plásmidos mediante electroforesis en gel de agarosa (sección 4.2) y se determinó la concentración y pureza mediante lectura de absorbancia a longitudes de onda de 260 nm y 280 nm (sección 4.9).

4.9. Determinación de la concentración y pureza de ADN

Los ácidos nucleicos absorben luz ultravioleta debido a la presencia de bases aromáticas nitrogenadas a lo largo de las cadenas del ADN. Ésta es una característica propia de la molécula, que presenta un máximo de absorción a una longitud de onda de 260 nm. A esta longitud de onda la absorción es proporcional a su concentración. Una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a una concentración de 50 µg.ml⁻¹ de ADN doble cadena (ADNdc).

La concentración y pureza de los plásmidos se determinó por medida de su absorbancia a λ=260 nm y λ=280 nm en espectrofotómetro UV-visible (Ultrospec 2000), según las ecuaciones 1 y 2 (Sambrook y col., 1989b).

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

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

El valor de pureza debe estar comprendido en un rango entre 1,8 y 2. Por fuera del mismo, la solución no es considerada apta para su uso en transfección de células eucariotas, ya que posee una cantidad considerable de contaminantes (proteínas, reactivos utilizados en la extracción, entre otros), que podrían afectar la eficiencia de la misma.

4.10. Obtención de los vectores necesarios para la expresión de los genes de las variantes mutadas del hIFN- α 2b en células de mamífero

4.10.1. Mutagénesis sitio-dirigida e inserción de la secuencia codificante para el péptido ANITVNITV en el hIFN- α 2b

La secuencia codificante del hIFN- α 2b empleada como molde para la generación de las distintas muteínas se obtuvo previamente en el laboratorio mediante extracción de ADN genómico a partir de células de sangre periférica humana y posterior PCR con oligonucleótidos específicos (Ceaglio, 2008).

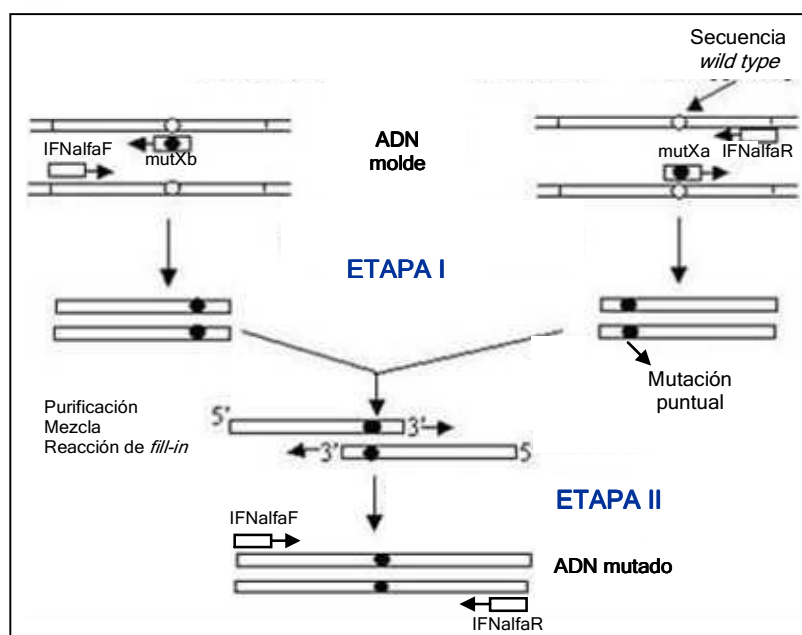


Fig. 9. Mutagénesis sitio-dirigida mediante ES-PCR.

La técnica se llevó a cabo en dos etapas. En la primera etapa se realizaron dos reacciones de PCR por separado utilizando oligonucleótidos externos, que hibridan en ambos extremos del gen del hIFN- α 2b clonado en el vector pCI-neo (IFNalfaF e IFNalfaR) y oligonucleótidos internos, que contienen la mutación puntual (mutXa y mutXb). Los productos de PCR obtenidos en ambas reacciones se purificaron a partir de un gel de agarosa y se emplearon como molde para la segunda etapa, en la que se realizó una única reacción de PCR. Los nueve primeros ciclos se realizaron sin el agregado de cebadores para permitir la hibridación y elongación del producto completo y, finalmente, se adicionaron los oligonucleótidos externos para lograr su amplificación.

El procedimiento de mutagénesis sitio-dirigida para la introducción de sitios susceptibles de N-glicosilación en el gen del hIFN- α 2b se llevó a cabo utilizando la técnica de extensión por solapamiento mediante PCR (ES-PCR), la cual consistió básicamente en dos etapas de PCR consecutivas (Ho y col., 1989) (Fig. 9).

En la primera etapa se realizaron dos reacciones de PCR independientes para generar dos fragmentos de ADN cuyos extremos se solapan. En el tubo A se utilizó un oligonucleótido externo, que hibrida en un extremo del gen del hIFN- α 2b clonado en el

vector pCI-neo, en sentido inverso (IFNalfaR), y un oligonucleótido interno, que contiene la mutación puntual, en sentido directo (mutXa, en donde X representa la posición del aminoácido mutado en la cadena polipeptídica). En el tubo B se realizó una mezcla de reacción utilizando un oligonucleótido externo, que hibrida en el otro extremo del gen del hIFN- α 2b clonado en el vector pCI-neo, en sentido directo (IFNalfaF), y un oligonucleótido interno, que contiene la mutación puntual, en sentido inverso (mutXb). En ambos casos se utilizó la enzima ADN polimerasa Platinum® Pfx (Invitrogen).

La mezcla de reacción se preparó de la siguiente manera:

Reactivo	Tubo A	Tubo B
<i>Pfx Amplification buffer</i> 10 X	5 μ l	5 μ l
MgSO ₄ 50 mM	1 μ l	1 μ l
dNTPs 10 mM	5 μ l	5 μ l
Oligonucleótido IFNalfaF 50 μ M	-	1 μ l
Oligonucleótido IFNalfaR 50 μ M	1 μ l	-
Oligonucleótido mutXa 50 μ M	1 μ l	-
Oligonucleótido mutXb 50 μ M	-	1 μ l
Molde (pCI-neo hIFN- α 2b) 100 μ g.ml ⁻¹	4 μ l	1 μ l
Platinum® Pfx	0,5 μ l	0,5 μ l
Agua autoclavada	csp 50 μ l	csp 50 μ l

La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Biometra) de acuerdo con el siguiente programa:

3 min a 94 °C
 1 min a 94 °C
 1 min a 55 °C
 1 min a 72 °C
 5 min a 72 °C

} 30 ciclos

Los productos de PCR obtenidos en ambas reacciones se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa y los fragmentos del tamaño esperado se purificaron.

La segunda etapa consistió en una única reacción de PCR para unir los dos fragmentos individuales de manera de obtener el gen del hIFN- α 2b completo con la mutación correspondiente. De esta manera, al combinar los dos fragmentos de ADN obtenidos de la etapa anterior, sus extremos hibridan entre sí y funcionan como cebadores para la extensión completa de ambas cadenas. El producto resultante se amplificó mediante el empleo de los oligonucleótidos externos IFNalfaF e IFNalfaR. La mezcla se preparó utilizando los siguientes reactivos:

Reactivo	
<i>Pfx Amplification buffer</i> 10 X	5 μ l
MgSO ₄ 50 mM	1 μ l
dNTPs 10 mM	5 μ l
Fragmento A purificado	5 μ l
Fragmento B purificado	5 μ l
Platinum [®] <i>Pfx</i>	0,5 μ l
Agua autoclavada	csp 50 μ l

En esta segunda etapa la reacción se caracterizó por presentar dos fases. La primera consistió en la hibridación de los fragmentos provenientes de los tubos A y B y el agregado de las bases necesarias para completar la secuencia. Esta primera fase se realizó durante 9 ciclos a una temperatura de hibridación específica. En la segunda fase se agregaron los oligonucleótidos externos IFNalfaF e IFNalfaR con el fin de amplificar la secuencia completa e introducir los sitios de restricción. Esta fase requirió una temperatura de hibridación diferente a la anterior, determinada por los oligonucleótidos externos.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador, utilizando el siguiente programa:

Paso 1:	3 min a 94 °C	
Paso 2:	1 min a 94 °C	} 9 ciclos
Paso 3:	1 min a 72 °C	
Paso 4:	1 min a 72 °C	
Paso 5:	Agregar 1 μ l de IFNalfaF e IFNalfaR	
Paso 6:	3 min a 94 °C	
Paso 7:	1 min a 94 °C	} 30 ciclos
Paso 8:	1 min a 56 °C	
Paso 9:	1 min a 72 °C	
Paso 10:	5 min a 72 °C	

El producto de PCR obtenido se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa, purificándose la banda correspondiente al gen mutado.

Los plásmidos empleados como molde en la primera etapa de PCR fueron: pCI-neo IFN4N, pCI-neo IFN3N y pCI-neo IFN2N. Los mismos fueron obtenidos durante la tesis doctoral desarrollada por la Dra. Natalia A. Ceaglio (Ceaglio, 2008). El primero de ellos, pCI-neo IFN4N, contiene 4 mutaciones: P4N, R23N, K70N y D77N, donde la primera letra indica el aminoácido presente en la secuencia nativa de la proteína; el número, su posición en la cadena aminoacídica y la última letra, el aminoácido por el cual se mutó el natural. El plásmido pCI-neo IFN3N contiene 3 mutaciones (P4N, K70N y D77N), mientras que el plásmido pCI-neo IFN2N presenta 2 mutaciones (P4N y D77N). En los tres casos, la

mutación de aminoácidos por Asn permitió la generación de secuencias susceptibles para N-glicosilación (N-X-T/S).

La generación de nuevas muteínas fue llevada a cabo mediante la introducción de una o dos mutaciones puntuales sobre los moldes mencionados. Dichas modificaciones consistieron en la mutación de aminoácidos por Thr con el objetivo de generar el tripéptido consenso. Por un lado, se introdujo la mutación F47T, de manera de generar un sitio susceptible de N-glicosilación en donde la cadena glicosídica se une potencialmente a la N45 presente en la secuencia no mutada. Por otro lado, se empleó la mutación L95T para generar un sitio de unión a oligosacáridos en la N93 de la secuencia nativa.

De esta manera, el plásmido pCI-neo IFN4N fue usado como molde para la generación de las variantes IFN4NM47 e IFN4NM95. El vector pCI-neo IFN3N se empleó para la obtención de las variantes IFN3NM47, IFN3NM95 e IFN3NM47/95. Por último, el molde pCI-neo IFN2N se utilizó para la obtención del IFN2NM47/95.

El procedimiento de mutagénesis por simple inserción permitió introducir la secuencia del péptido de 9 aminoácidos ANITVNITV en el extremo N-terminal del IFNwt, IFN4N e IFN3NM47, para así generar las variantes IFNwtMutNter, IFN4NMutNter e IFN3NM47MutNter, respectivamente. Este péptido provee a las nuevas variantes dos sitios potenciales para N-glicosilación adicionales. Es importante tener en cuenta que la secuencia del hIFN- α 2bwt posee un péptido de secreción, motivo por el cual la introducción de la secuencia de interés debe realizarse por inserción. Al igual que en el caso anterior, este protocolo también consta de dos etapas (Fig. 10).

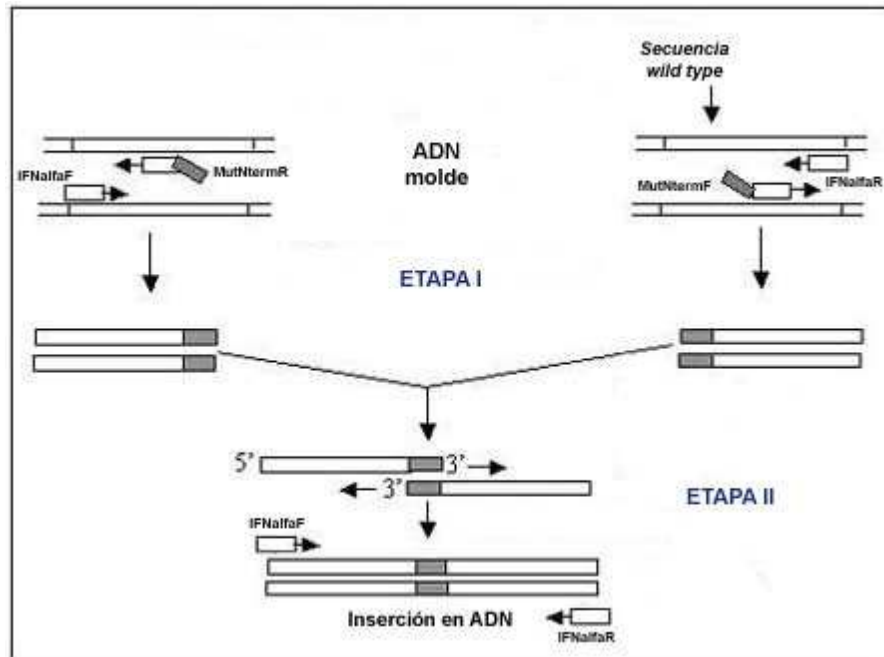


Fig. 10. Mutagénesis por simple inserción.

La técnica se llevó a cabo en dos etapas. En la primera etapa se realizaron dos reacciones de PCR por separado utilizando oligonucleótidos externos, que hibridan en ambos extremos del gen del hIFN- α 2b clonado en el vector pCI-neo (IFNalfaF e IFNalfaR), y oligonucleótidos internos, que permiten introducir la secuencia del péptido de interés (MutNtermFwt, MutNtermF4N y MutNtermR). Los productos de PCR obtenidos en ambas reacciones se purificaron a partir de un gel de agarosa y se emplearon como molde para la segunda etapa, en la que se realizó una única reacción de PCR. Los nueve primeros ciclos se realizaron sin el agregado de cebadores para permitir la hibridación y elongación del producto completo y, finalmente, se adicionaron los oligonucleótidos externos para lograr su amplificación.

En la primera etapa se realizaron dos reacciones de PCR independientes que permiten introducir la secuencia del péptido ANITVNITV, generando dos fragmentos de ADN cuyos extremos se solapan. En el tubo A se utilizó un oligonucleótido externo, que hibrida en el extremo 3' del gen del hIFN- α 2b clonado en el vector pCI-neo, en sentido inverso (IFNalfaR), y un oligonucleótido interno, que contiene la secuencia de interés más 15 nucleótidos que hibridan con el comienzo de la secuencia del hIFN- α 2b maduro en sentido directo (MutNtermFwt, que hibrida sobre la secuencia del IFNwt o MutNtermF4N, que permite modificar secuencias que presenten la mutación P4N). En el tubo B se realizó una mezcla de reacción utilizando un oligonucleótido externo, que hibrida en el extremo 5' del gen del hIFN- α 2b clonado en el vector pCI-neo, en sentido directo (IFNalfaF), y un oligonucleótido interno, que contiene la secuencia de interés más 15 nucleótidos que hibridan con el extremo 3' del péptido señal, en sentido inverso (MutNtermR). En ambos casos se utilizó la enzima ADN polimerasa Platinum® Pfx (Invitrogen).

La mezcla de reacción se preparó de la siguiente manera:

Reactivo	Tubo A	Tubo B
<i>Pfx Amplification buffer</i> 10 X	5 µl	5 µl
MgSO ₄ 50 mM	1 µl	1 µl
dNTPs 10 mM	5 µl	5 µl
Oligonucleótido IFNalfaF 50 µM	-	1 µl
Oligonucleótido IFNalfaR 50 µM	1 µl	-
Oligonucleótido MutNtermFwt/MutNtermF4N 50 µM	1 µl	-
Oligonucleótido MutNtermR 50 µM	-	1 µl
Molde (pCl-neo rhIFN-α2b) 100 µg.ml ⁻¹	4 µl	1 µl
Platinum [®] <i>Pfx</i>	0,5 µl	0,5 µl
Agua autoclavada	csp 50 µl	csp 50 µl

La reacción se llevó a cabo en un termociclador, de acuerdo con el siguiente programa:

3 min a 94 °C
 1 min a 94 °C
 1 min a 50 °C
 1 min a 72 °C
 5 min a 72 °C

} 30 ciclos

Al igual que para el procedimiento de mutagénesis sitio-dirigida, los productos de PCR obtenidos en ambas reacciones de la primera etapa fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa y posteriormente purificados.

El fundamento de la segunda etapa de PCR es el mismo que se describió para el protocolo de mutagénesis sitio-dirigida y permite obtener la secuencia completa del hIFN-α2b con el péptido ANITVNITV insertado en su extremo N-terminal. Los oligonucleótidos externos IFNalfaF e IFNalfaR permitieron amplificar el producto resultante. La mezcla se preparó utilizando los siguientes reactivos:

Reactivo	
<i>Pfx Amplification buffer</i> 10 X	5 µl
MgSO ₄ 50 mM	1 µl
dNTPs 10 mM	5 µl
Fragmento A purificado	5 µl
Fragmento B purificado	5 µl
Platinum [®] <i>Pfx</i>	0,5 µl
Agua autoclavada	csp 50 µl

La reacción se llevó a cabo en un termociclador, utilizando el siguiente programa:

Paso 1:	3 min a 94 °C	
Paso 2:	1 min a 94 °C	} 9 ciclos
Paso 3:	1 min a 72 °C	
Paso 4:	1 min a 72 °C	
Paso 5:	Agregar 1 µl de IFNalfaF e IFNalfaR	
Paso 6:	3 min a 94 °C	
Paso 7:	1 min a 94 °C	} 30 ciclos
Paso 8:	1 min a 56 °C	
Paso 9:	1 min a 72 °C	
Paso 10:	5 min a 72 °C	

En la Tabla II se muestran las secuencias de todos los oligonucleótidos empleados, así como el tamaño esperado de cada uno de los fragmentos obtenidos luego de la primera etapa de PCR. Los oligonucleótidos externos IFNalfaF e IFNalfaR contienen los sitios de restricción para las enzimas *EcoR* I y *Xba* I, respectivamente, para realizar el clonado posterior de las mutéínas en el vector pCI-neo.

Tabla II. Oligonucleótidos empleados en los procedimientos de mutagénesis

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño del fragmento (Primera etapa)
IFNalfaF	5' TAACGAATTCACATCTACAATGGCCTTGAC 3' <i>EcoR</i> I	-
IFNalfaR	5' ATAGTCTAGAGTCTTTGAAATGGCAGATCA 3' <i>Xba</i> I	-
mut47a	5' GGAGTTTGGCAACCAG ACCC AAAAGGCTG 3'	463 pb
mut47b	5' CAGCCTTTTGG GT CTGGTTGCCAAACTCC 5'	239 pb
mut95a	5' CCAGCAGCTGAATGAC ACG GAAGCCTGTGTG 3'	319 pb
mut95b	5' CACACAGGCTTCC GT GCATTCAGCTGCTGG 3'	385 pb
MutNterFwt	5'GCCAACATCACCGTGAACATCACCGTGT TGTGATCTGCCTCAA 3'	612 pb
MutNterF4N	5'GCCAACATCACCGTGAACATCACCGTGT TGTGATCTGAATCAA 3'	612 pb
MutNterR	5'CACGGTGATGTTACCGGTGATGTTGGCGCC CCACAGAGCAGCT 3'	115 pb

Los nucleótidos mutados se señalan en negrita. Los codones que se traducen en el aminoácido mutado se encuentran subrayados. Los nucleótidos sombreados indican el fragmento de la secuencia que hibrida con el comienzo de la secuencia del IFN (oligonucleótidos en sentido directo, F) y con el fin del péptido señal (oligonucleótidos en sentido inverso, R).

4.10.2. Clonado de los genes de las muteínas del hIFN- α 2b en el vector de expresión pCI-neo

El plásmido pCI-neo (Promega) posee un origen de replicación bacteriana que permite su amplificación en *E. coli* (f1 ori) y un gen que codifica para resistencia a ampicilina en estas células (Amp^R). El sitio de múltiple clonado se encuentra corriente abajo del *enhancer* y promotor temprano de citomegalovirus (CMV), lo que permite una fuerte expresión del gen exógeno de interés en células eucariotas. El intrón quimérico compuesto por el sitio 5' de *splicing* del intrón de la β -globulina y el sitio 3' de *splicing* del intrón de la IgG también puede incrementar la expresión. La señal de poliadenilación tardía del virus SV40 permite un eficiente procesamiento del ARN. Además, este vector contiene el gen de la neomicina fosfotransferasa (Neo^R), el cual permite seleccionar las células eucariotas transfectadas en forma estable.

Para realizar el clonado de los genes de las muteínas del hIFN- α 2b para su expresión en células eucariotas, los productos obtenidos en la segunda etapa de PCR se digirieron con las enzimas *EcoR* I y *Xba* I (sección 4.1) y se purificaron a partir de la solución con el fin de eliminar los fragmentos cortos de ADN liberados, las sales y las enzimas de restricción. Por otro lado, el vector pCI-neo fue digerido con las mismas enzimas y ligado a la secuencia de ADN de interés. Luego de la transformación bacteriana, se seleccionaron clones al azar y se analizó la presencia del inserto mediante digestión con las mismas enzimas de restricción. Finalmente, se realizó la secuenciación automática del ADN plasmídico de clones positivos para verificar la presencia de las mutaciones introducidas. Se emplearon los oligonucleótidos T3 y T7, los cuales hibridan con los promotores de la ARN polimerasa de los fagos T3 y T7, respectivamente. En la Fig. 11 se muestra un esquema de la construcción pCI-neo hIFN- α 2b.

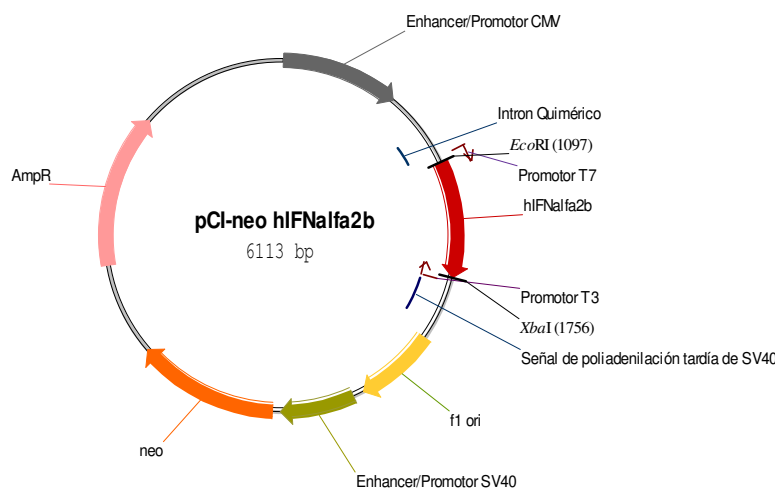


Fig. 11. Representación gráfica del plásmido pCI-neo hIFN- α 2b.

4.10.3. Clonado de los genes de las muteínas del hIFN- α 2b en el vector de expresión pLV-PLK

El plásmido pLV-pLK corresponde al vector de transferencia del sistema de partículas lentivirales de tercera generación y posee un origen de replicación bacteriano (ORI), un gen que otorga resistencia a ampicilina y un sitio de múltiple clonado corriente abajo del promotor CMV. Además, presenta el gen que codifica para la enzima puromicina N-acetiltransferasa dirigido por el promotor SV40, lo cual permite la selección de células eucariotas con el antibiótico puromicina (sección 5.5).

Por otro lado, conserva determinados elementos de origen viral, como la región RRE, altamente estructurada, que actúa como sitio de unión para la proteína Rev, la cual permite el transporte de los ARNs sin procesar o parcialmente procesados desde el núcleo al citoplasma; una región PBS (sitio de unión de cebadores), que actúa como cebador para la transcriptasa reversa, en el momento de iniciar la síntesis de la hebra (-) del ADN viral; la secuencia cPPT (segmento polipurina central), que actúa como cebador de la hebra (+) en la síntesis del ADN viral; un elemento regulatorio postranscripcional del virus de la hepatitis de Woodchuck (WPRE) y una señal de empaquetamiento (Psi), secuencia corta y altamente estructurada requerida para la incorporación del ARN genómico en el interior de las partículas virales. Todas las regiones necesarias para la generación de los vectores lentivirales se encuentran comprendidas entre las repeticiones terminales largas modificadas previamente descriptas en la introducción (5' LTR y 3' LTR).

Para llevar a cabo la construcción de los vectores pLV-pLK conteniendo los genes que codifican para las diferentes muteínas glicosiladas del hIFN- α 2b, se llevó a cabo la digestión de los vectores pCI-neo IFN construidos anteriormente con las enzimas de restricción *Nhe* I y *Sal* I (sección 4.1). El producto de la digestión fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa (sección 4.2) y el fragmento liberado correspondiente a las diferentes variantes de la molécula en estudio, de aproximadamente 700 pb, fue purificado (sección 4.3). Paralelamente se llevó a cabo la digestión del vector pLV-PLK (Fig. 12) con las mismas enzimas de restricción. El mismo fue purificado de acuerdo al protocolo descrito en la sección 4.4. Ambos productos fueron empleados para realizar la reacción de ligación (sección 4.5) que se utilizó para la posterior transformación bacteriana.

4.11. Criopreservación de cepas bacterianas

Para la conservación de bacterias, ya sea no transformadas o recombinantes, se procedió a cultivarlas durante 18 h a 37 °C en medio LB o medio LB suplementado con ampicilina, respectivamente. Posteriormente, se tomaron 800 µl del cultivo y se le adicionaron 200 µl de glicerol (Merck) estéril, homogeneizando para asegurar la distribución del glicerol. Finalmente, fueron conservadas a -70 °C (Sambrook y col., 1989a).

4.12. Revitalización de cepas bacterianas

Para recuperar las bacterias congeladas, se obtuvo una pequeña porción de material con un ansa estéril a partir de la superficie del cultivo congelado e inmediatamente se realizó una estría en una placa de agar LB, para bacterias no transformadas, o en una placa de agar LB suplementado con ampicilina, para bacterias recombinantes. El criotubo se conservó nuevamente a -70 °C y la placa se incubó a 37 °C durante toda la noche. Posteriormente, se tomó una colonia bacteriana aislada y se amplificó el cultivo en medio LB según los requerimientos de la experiencia a realizar (Sambrook y col., 1989a).

5. Técnicas de cultivos celulares

5.1. Condiciones de cultivo de células de mamífero

Todas las líneas celulares eucariotas se cultivaron en condiciones estándar de cultivo para células de mamífero, es decir, en estufa gaseada a 37 °C, en atmósfera de CO₂ al 5% saturada de humedad (Nuaire).

Se emplearon los siguientes sistemas de cultivo:

- Placas multipozos de poliestireno (Greiner) de 96, 24, 12 y 6 pozos con una superficie de 0,4; 2; 5 y 9,6 cm² por pozo, respectivamente.
- Frascos T (Greiner) de 25, 75 y 175 cm² de superficie.
- Frascos T triples (Nunclon) de 500 cm² de superficie.

En todos los casos se mantuvo una relación constante de 0,4 ml de medio de cultivo por cada cm² de superficie, de acuerdo con lo establecido por Freshney (2000a). Las líneas celulares que crecen adhiriéndose a una superficie sólida (sustrato) forman una monocapa. Para realizar subcultivos se las debe liberar de este sustrato por medios mecánicos o enzimáticos. Para tal fin, cuando los cultivos alcanzaron la confluencia, es decir cubrieron la totalidad de la superficie de los frascos donde se estaban desarrollando, 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 solución reguladora de fosfato salino [PBS: KH₂PO₄ (Sigma) 0,6 g.l⁻¹, Na₂HPO₄ (Sigma) 0,78 g.l⁻¹, NaCl 8,8 g.l⁻¹, pH 7,4] durante 15 s a temperatura ambiente, con el fin de neutralizar la acción de factores antitripsina presentes en el SFB. Se respetó una relación de 20 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 las líneas celulares que crecen en suspensión, como es el caso de las células Daudi, los subcultivos se efectuaron por simple dilución en el medio de cultivo fresco correspondiente.

5.2. 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 azul de tripán (Cook y Mitchell, 1989). Esta técnica se basa en el hecho de que las células viables no captan ciertos colorantes, mientras que las células muertas presentan una alteración de la membrana plasmática que permite el ingreso del colorante hacia su interior.

Con este fin, la suspensión celular se incubó durante 1 min con una solución de azul de tripán 0,4% (V/V) en PBS y posteriormente se sembró en la cámara de recuento, empleando diluciones convenientes de acuerdo con la densidad celular 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 sean vivas o muertas, se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$X \text{ (cél.ml}^{-1}\text{)} = N^{\circ} \text{ de células contadas} \times 10^4 \times \frac{1}{4} \times (\text{dilución})^{-1} \quad (3)$$

La viabilidad del cultivo se determinó calculando el porcentaje de células viables con respecto a las totales (ecuación 3), teniendo en cuenta que la concentración de células totales (X_t) es la suma de la concentración de células muertas (X_m) y vivas (X_v).

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

5.3. Transfecciones de células eucariotas

La introducción de ADN exógeno en células eucariotas se realizó empleando la técnica de transfección mediada por lípidos catiónicos o lipofección (Felgner y col., 1987). En soluciones acuosas, los lípidos catiónicos forman pequeñas vesículas unilaminares (liposomas), con un tamaño promedio entre 600 y 1200 nm. El método se basa en la interacción iónica de estos liposomas, cuya superficie se encuentra cargada positivamente, tanto con los grupos fosfato del ADN como con las cargas negativas de la superficie celular.

El ADN en solución no es encapsulado dentro del liposoma, sino que se une espontáneamente a las cargas positivas de los mismos formando complejos que son captados por las células en cultivo, como se observa en la Fig. 13. El método original fue mejorado mediante el reemplazo del lípido monocatiónico por reactivos policatiónicos, como el Lipofectamine™ (Hawley-Nelson y col., 1993).

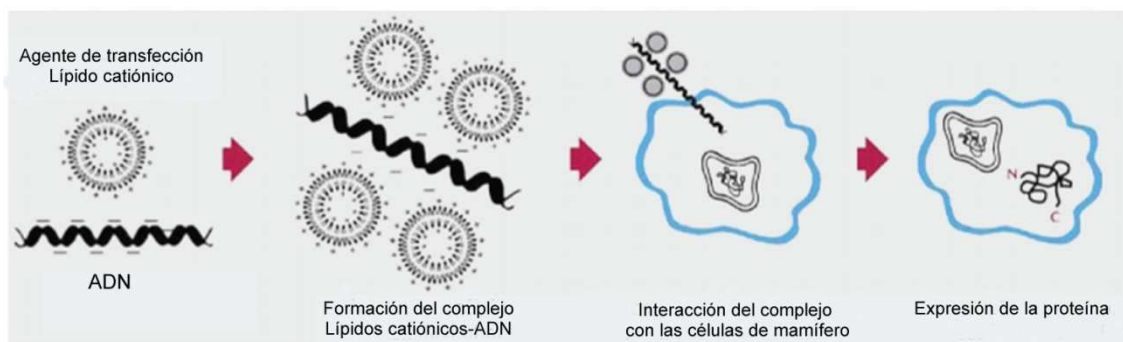


Fig. 13. Representación gráfica del proceso de transfección con lípidos catiónicos.

5.3.1. Transfección de células CHO para la expresión de las variantes glicosiladas del hIFN- α 2b

Las condiciones óptimas de transfección para la línea celular CHO fueron puestas a punto previamente en el laboratorio, analizando las eficiencias de transfección de diferentes lípidos catiónicos comerciales en distintas proporciones lípido:ADN. En este caso, se utilizó el lípido Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen), para el cual se estableció una relación óptima lípido:ADN de 2:1 (Zuqueli, 2006). A continuación, se detallan los pasos realizados.

Las células CHO fueron cultivadas en medio DMEM/Ham's F-12 suplementado con SFB 5% (V/V). Cuando el cultivo se encontraba en fase de crecimiento exponencial, las células se cosecharon mediante desprendimiento enzimático con tripsina-EDTA, se contaron y se resuspendieron en el mismo medio de cultivo de manera de obtener una densidad celular de $1,5 \cdot 10^5$ cél.ml⁻¹. Se sembraron 3 ml de esta suspensión en las cavidades de una placa de cultivo estéril de 6 pozos. Se incubó durante 24 h a 37 °C, hasta alcanzar aproximadamente un 80% de confluencia. Se retiró el sobrenadante de los pozos y, con el fin de eliminar los restos de SFB, las células se lavaron con 3 ml de medio DMEM/Ham's F-12 basal.

Para cada pozo, se preparó una solución $33,3 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ del lípido, mezclando 10 μl de Lipofectamine™ 2000 ($1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) con 290 μl de medio DMEM/Ham's F-12. Por otro lado, se preparó una solución del plásmido $16,6 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, mezclando el volumen correspondiente de ADN con el medio de cultivo mencionado hasta un volumen final de 300 μl . Se mezclaron ambas soluciones y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente para permitir la

formación de los complejos. Como control de la toxicidad del lípido sobre las células, se mezclaron 300 µl de la solución de lípido con 300 µl de medio DMEM/Ham's F-12. Posteriormente, se adicionaron 400 µl de medio de cultivo para llevar la solución a un volumen final de 1 ml.

Se eliminó la solución de lavado de las células a transfectar y se agregaron, gota a gota, los complejos ADN-lípidos preparados, incubándose durante 5 h a 37 °C. Finalmente, se retiró el sobrenadante de las placas de cultivo y se agregaron 3 ml de medio DMEM/F-12 suplementado con SFB 5% (V/V), incubándose durante 72 h a 37 °C.

Se cosecharon los sobrenadantes de los pozos, se centrifugaron a 100 g durante 8 min para eliminar restos celulares y se conservaron a -20 °C para su análisis. Las células transfectadas se trataron con tripsina-EDTA y se mantuvieron en cultivo para las siguientes etapas del proceso.

5.3.2. Transfección de células HEK para el ensamblado de partículas lentivirales

La mayoría de los vectores lentivirales se basan en el HIV-1. Estos vectores 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. La mayoría de los vectores lentivirales disponibles actualmente se basan en vectores lentivirales de segunda y tercera generación, que han sido mejorados para optimizar su seguridad e infectividad (Sakuma y col., 2012). En el presente trabajo se utilizaron vectores lentivirales de tercera generación, cuyas características se detallan en la sección Introducción.

Las partículas lentivirales empleadas en el proceso de transducción se obtuvieron mediante co-transfección de células HEK, empleando la técnica de lipofección con cuatro plásmidos distintos (Fig. 14):

- 1- pREV, expresado durante el empaquetamiento para inducir la exportación nuclear del vector de transferencia y su empaquetamiento;
- 2- pVSV-G, que codifica la proteína G de envoltura del VSV, necesaria para la entrada de la partícula viral en la célula y que provee estabilidad y un amplio tropismo a los vectores lentivirales;
- 3- pMDL, que 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-vector para la integración al genoma celular;

- 4- plásmido de transferencia pLV-pLK, que codifica para la proteína de interés y confiere a las células resistencia a puromicina.

A continuación se detalla el procedimiento llevado a cabo.

Las células HEK se cultivaron a una densidad de $4 \cdot 10^5$ cél.ml⁻¹, en placas de 10 cm de diámetro, empleando medio D-MEM para HEK suplementado con SFB 10% (V/V).

Luego de 24 h de incubación se llevó a cabo el procedimiento de lipofección. Para ello se prepararon, por cada vector de transferencia, 2,5 ml de medio de cultivo para células HEK conteniendo 2,5 µg de pREV; 3,6 µg de pVSV-G; 6,5 µg de pMDL y 10 µg del plásmido de transferencia pLV-pLK conteniendo la proteína de interés. Por otro lado, en un tubo cónico se preparó una solución 20 µg.ml⁻¹ del lípido, mezclando 2,5 ml de medio de cultivo para células HEK con 50 µl de Lipofectamine™ 2000 (1 mg.ml⁻¹), homogeneizando con vórtex y dejando reposar 5 min. Luego, el contenido de ambos tubos cónicos se mezcló gota a gota para favorecer la formación homogénea de los complejos ADN-lípidos. Se retiró el sobrenadante de las placas de cultivo conteniendo las células HEK y se adicionó la mezcla ADN-lípidos gota a gota, incubándose durante 5 h.

Luego de la incubación, el cultivo se suplementó con 5 ml de medio de cultivo para células HEK con SFB 20% (V/V), de modo de obtener una concentración final de suero 10% (V/V). Se incubó a 37 °C durante 48 h.

Finalmente, se cosecharon los sobrenadantes de cultivo conteniendo las partículas lentivirales y se centrifugaron a 100 g durante 8 min a temperatura ambiente para eliminar las células remanentes. Se recuperó el sobrenadante y se fraccionó en tubos cónicos de 1,5 ml (1 ml). Los tubos se almacenaron a -70 °C hasta su utilización, para conservar un elevado título viral.

5.4. Transducción de células eucariotas

Con el fin de obtener líneas celulares estables productoras de las moléculas de interés, se realizaron transducciones de células CHO empleando partículas lentivirales conteniendo los genes de interés (Fig. 14). Si bien esta técnica es más laboriosa e insume más tiempo que la transfección, el proceso es altamente eficiente.

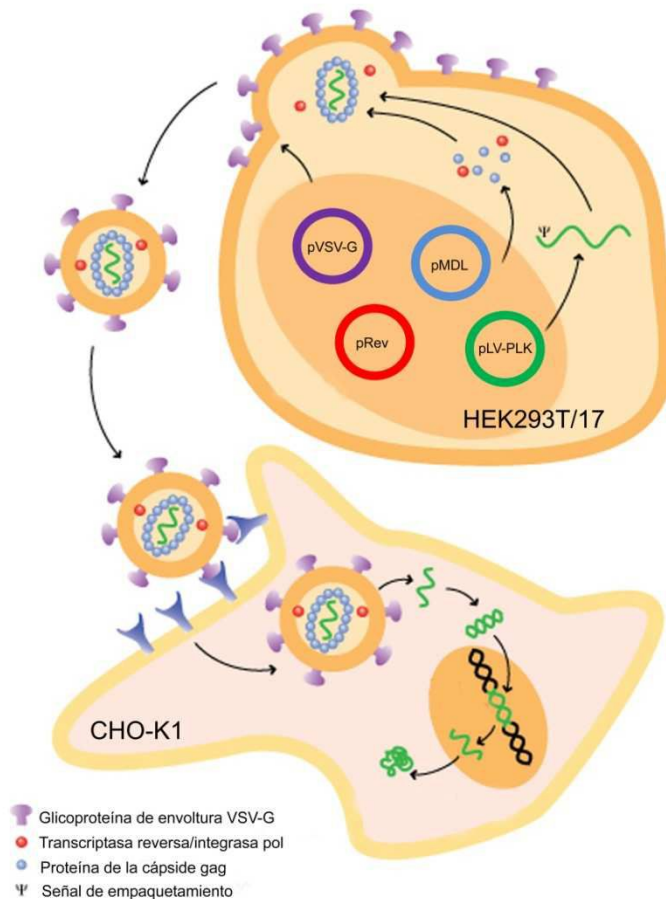


Fig. 14. Representación gráfica del proceso de ensamblado de partículas lentivirales en células HEK y transducción de células CHO.

Para realizar la transducción se procedió de la siguiente manera: las células CHO se sembraron en placas estériles de 6 pozos a una densidad de $3 \cdot 10^4$ cél.ml⁻¹, y se cultivaron en medio DMEM/Ham's F-12 suplementado con SFB 5% (V/V) durante 24 h. Posteriormente, se descartó el sobrenadante de cultivo y se adicionó 1 ml de la cosecha de partículas lentivirales, incubándose durante 24 h a 37 °C. Se retiró el sobrenadante de cultivo conteniendo las partículas lentivirales y se reemplazó por 3 ml de medio DMEM/Ham's F-12 suplementado con SFB 5% (V/V). Luego de 72 h, se cosecharon los sobrenadantes, se centrifugaron a 100 g durante 8 min y se conservaron a -20 °C hasta su utilización. Por otro lado, las células transducidas se trataron con tripsina-EDTA y se subcultivaron para continuar con las siguientes etapas del proceso.

5.5. Presión de selección con antibiótico de las líneas celulares generadas mediante transducción

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

El proceso consistió en sembrar las células CHO y HEK a una densidad de $2 \cdot 10^5$ cél.ml⁻¹, empleando su correspondiente medio de crecimiento conteniendo una determinada cantidad de antibiótico, apropiada para cada línea celular. Se comenzó la presión con una concentración de puromicina de 10 µg.ml⁻¹, analizando posteriormente el crecimiento celular y las concentraciones de IFN en el sobrenadante de cultivo. De acuerdo a los resultados obtenidos, se continuó con el proceso de selección con concentraciones crecientes de puromicina. El incremento gradual de antibiótico se extendió hasta observar la muerte de los cultivos celulares o bien, una disminución de la productividad celular específica.

Al finalizar la presión de selección, se retiró el medio de cultivo y se reemplazó por medio sin antibiótico para permitir la recuperación de las células que permanecieron viables. Éstas se mantuvieron en cultivo hasta alcanzar la confluencia, procediéndose luego a su criopreservación (sección 5.9).

5.6. Clonado de las líneas celulares productoras de las muteínas del hIFN- α 2b

Las líneas celulares transfectadas en forma estable o transducidas constituyen un grupo heterogéneo de células que presentan diferencias en sus características de crecimiento, niveles de expresión y, en algunos casos, calidad del producto. Las marcadas diferencias en los niveles de expresión de las proteínas recombinantes se deben principalmente a dos factores: diferente número de copias e integración en sitios con distinta actividad transcripcional (Hauser, 1997). El propósito del clonado es asegurar que toda la progenie celular de un cultivo descienda de una única célula, es decir, sean genéticamente idénticas. Esto permite aislar células altamente productoras de aquéllas que no lo son, luego de los eventos de transfección o transducción y selección iniciales (Mather, 1991).

El clonado celular de las líneas obtenidas se realizó mediante el método de dilución límite (Freshney, 2000c; Mather, 1991). El mismo consiste en preparar una suspensión celular de manera de obtener una única célula en una unidad de volumen de medio de cultivo, el cual luego es dispensado en pozos de una placa de microtitulación. La probabilidad estadística de obtener pocillos con un único clon se puede incrementar reduciendo la densidad de siembra a un nivel tal que permita depositar una proporción de una sola célula cada 5 o 10 cavidades. Debido a las bajas densidades celulares que se

emplean en este tipo de clonado, el medio de cultivo debe contener suficiente cantidad de nutrientes y factores de crecimiento que no son aportados por las células vecinas como ocurre en los cultivos densos. Por este motivo, se suelen emplear altas concentraciones de SFB y/o medios condicionados por el crecimiento de otras células o capas de células alimentadoras. El clonado se considera efectivo cuando se observa crecimiento, como máximo, en el 30% de los pozos sembrados con una proporción de una célula cada 10 pozos y una célula por pozo.

Con este fin, se prepararon suspensiones celulares de las líneas a clonar en medio DMEM/Ham's F12 o medio DMEM, según corresponda, suplementado con SFB 20% (V/V), cuyas concentraciones fueron 1 cél. ml^{-1} y 5 cél. ml^{-1} . Se dividieron dos placas de 96 pozos en dos sectores, sembrando en cada uno de ellos 200 μl por pozo de las correspondientes suspensiones celulares, de manera de obtener en cada placa la misma cantidad de pozos con un promedio de 0,2 células y 1 célula. En los pozos donde se detectó el crecimiento de una única colonia, se evaluó la expresión de hIFN- α 2b mediante técnica de ELISA sándwich (sección 7.2.1.). Los clones que mostraron mayor producción de hIFN- α 2b fueron amplificados por duplicado a placas de 24 pozos. Una de las placas se destinó a la amplificación de los clones para su posterior criopreservación. La otra placa se utilizó para seleccionar los clones en función de su productividad celular. Para ello, los clones se sembraron en una densidad celular de $4 \cdot 10^5 \text{ cél. ml}^{-1}$ (Ci), incubándose durante 24 h a 37 °C. Posteriormente, se cosechó el sobrenadante y se determinó la concentración de IFN presente en el mismo mediante técnica de ELISA sándwich. Por otro lado, se realizó el recuento celular (Cf), calculándose la productividad específica aproximada según la ecuación 5 de la sección 5.7.

5.7. Determinación de la productividad celular

Para determinar la velocidad de producción específica o productividad de las líneas celulares productoras de las variantes hiperglicosiladas del hIFN- α 2b sometidas a presión de selección con diferentes concentraciones de puromicina, así como también de los clones recombinantes, las células fueron cultivadas por duplicado en una placa de 24 pozos, en una densidad celular de $4 \cdot 10^5 \text{ cél. ml}^{-1}$. Luego de 24 h se retiró el sobrenadante de cultivo de uno de los pocillos y se adicionó el medio de cultivo de crecimiento correspondiente a cada línea celular. El otro pozo fue empleado para el recuento celular (concentración inicial de células, Ci). La placa se incubó a 37 °C durante 24 h. Finalmente, se cosechó el sobrenadante de cultivo del pocillo restante, se centrifugó a 100 g durante 8 min y se conservó a -20 °C. Además, se determinó la densidad celular del cultivo (concentración final de células, Cf) para calcular la productividad, teniendo en cuenta sólo la concentración de los sobrenadantes luego de 24 h de cultivo, dado que la concentración de inicio se consideró

nula como consecuencia del recambio de medio de cultivo. Para esto, se empleó la ecuación 5, donde t es el tiempo de incubación (en este caso 24 h) y C_{IFN} , corresponde a la concentración de la variante de IFN determinada por técnica de ELISA sándwich (sección 7.2.1) luego de 24 h de cultivo:

$$q_{IFN} (\text{ng} \cdot 10^6 \cdot \text{cél}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}) = \frac{C_{IFN} (\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1})}{\frac{(C_i + C_f)}{2} (\text{cél} \cdot \text{ml}^{-1}) \cdot t (\text{días})} 10^6 \quad (5)$$

5.8. Evaluación del crecimiento y producción de las diferentes variantes del hIFN- α 2b por parte de los clones celulares seleccionados

Con el propósito de estudiar el crecimiento y la producción de cada uno de los clones seleccionados, se construyeron curvas de crecimiento de los mismos. Para ello, se cultivaron los clones a partir de una densidad de $5 \cdot 10^4$ $\text{cél} \cdot \text{ml}^{-1}$ en una placa de 24 pozos, utilizando 10 pocillos para cada clon, en medio de cultivo de crecimiento. Se reservó una alícuota de la suspensión inicial para realizar un recuento celular (sección 5.2) que se consideró como “inicio o tiempo=0 del ensayo”. Asimismo, dicha muestra se centrifugó durante 8 min a 200 g y el sobrenadante se conservó a -20 °C para luego ser evaluado mediante técnica de ELISA sándwich (sección 7.2.1) y, de esta manera, determinar la producción de la variante en estudio. Transcurridas 24 h de incubación a 37 °C, se cosechó el sobrenadante de cultivo del segundo pozo, el cual fue centrifugado y conservado como se describió para el primer pozo. Las células fueron tratadas con tripsina-EDTA y resuspendidas en medio de cultivo, realizándose el recuento celular correspondiente. Este procedimiento se repitió cada 24 h con los 9 pozos restantes.

5.8.1. Monitoreo del consumo de glucosa y de la producción de lactato, amonio y de la variante de IFN en sobrenadantes de cultivo

Glucosa

La determinación de glucosa se llevó a cabo por el método enzimático de la glucosa oxidasa/peroxidasa (GOD/POD), utilizando el kit comercial “Glucosa Enzimática” (*Sociedad de Bioquímicos*, SB), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El mismo se basa en la oxidación específica de D-glucosa por parte de la enzima GOD, con formación estequiométrica de peróxido de hidrógeno. Este último, en presencia de 4-aminofenazona y fenol, forma una quinoneimina roja mediante una reacción catalizada por la enzima POD. De esta manera, el dosaje espectrofotométrico del producto coloreado permite la cuantificación indirecta de glucosa en la muestra.

Lactato

La determinación de lactato se llevó a cabo por el método enzimático, utilizando el kit comercial “*Lactate*” (Wiener Lab), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El mismo se basa en la oxidación específica del lactato por parte de la enzima lactato-oxidasa (LOD), con formación estequiométrica de peróxido de hidrógeno. Este último, es luego utilizado por la peroxidada (POD) para generar un cromógeno. De esta manera, el dosaje espectrofotométrico del producto coloreado ($\lambda = 540 \text{ nm}$) permite la cuantificación indirecta de lactato en la muestra.

Amonio

La cuantificación de amonio se llevó a cabo utilizando una adaptación de la técnica desarrollada para la cuantificación de urea, con el kit “*Urea*” (*Sociedad de Bioquímicos*, SB), donde los iones amonio presentes en la muestra se determinan mediante la reacción de Berthelot. La reacción se desarrolla en varias etapas, que tienen lugar en medio alcalino. El indofenol en medio alcalino se disocia dando azul de indofenol, compuesto fuertemente coloreado de azul. La intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de amonio presente en la muestra. Para acelerar la reacción entre amonio e hipoclorito, disminuyendo el tiempo de incubación, se agrega nitroprusiato de sodio $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]$ como catalizador.

Variantes de hIFN- α 2b

La concentración de cada variante en estudio a partir de sobrenadantes de cultivo fue calculada como concentración de hIFN- α 2b mediante técnica de ELISA sándwich (sección 7.2.1).

5.8.2. Estimación de parámetros cinéticos de cultivo. Determinación de la integral de células viables (ICV), velocidad específica de crecimiento celular y de las velocidades específicas de consumo y producción de metabolitos

Para estimar los parámetros cinéticos de cultivo, en primer lugar se calculó la integral de células viables (ICV). Si se considera que una especie P en un cultivo depende de la cantidad de células viables a cada tiempo $X_v(t)$, entonces la variación de P en el tiempo se puede expresar matemáticamente como:

$$\frac{dP}{dt} = X_v(t) \cdot q_p \quad (10)$$

donde q_p es una constante asociada con la productividad de una línea celular definida, en un determinado conjunto de condiciones de cultivo. En el caso de los metabolitos estudiados, el valor q_p representa directamente las velocidades específicas de consumo o producción. En

el caso de la variación de la concentración celular, la constante de proporcionalidad es igual a la velocidad específica de crecimiento. Integrando la ecuación anterior se tiene que:

$$P(t) = \int dP = q_p \int X_v(t) dt \quad (11)$$

Esta expresión indica que la concentración de la variable en estudio en cualquier tiempo t es proporcional a la integral en el tiempo de la curva de células viables, o ICV, en el mismo tiempo t (Renard y col., 1988). De esto se desprende que la curva de producción o consumo de la especie y la curva integral deben mostrar perfiles análogos y la regresión de una sobre la otra debe ser lineal. La ICV resulta así una medida de la cantidad de células metabólicamente activas presentes en un cultivo durante un período discreto de tiempo que determinan la concentración de una especie P a cada tiempo t y con una productividad q_p . Tiene unidades de cél.h.ml^{-1} .

Una vez estimados los valores de ICV, las velocidades específicas de crecimiento celular, consumo de glucosa y producción de lactato, amonio e IFN se calcularon graficando en cada caso la producción o consumo acumulado a cada tiempo de cultivo en función de la ICV. A partir de cada gráfica, se realizaron los ajustes lineales correspondientes y se obtuvieron los valores de los parámetros cinéticos q_p a partir de las pendientes de las rectas de ajuste. El criterio adoptado para aplicar la regresión lineal fue seleccionar aquellos puntos experimentales que permitieran obtener coeficientes de correlación iguales o superiores a 0,95. En todos los casos los cálculos se realizaron utilizando el software *Origin 7.0* (OriginLab).

5.9. Criopreservación de líneas y clones celulares de mamíferos

Cuando se ha obtenido una línea celular o se ha seleccionado un clon con las características deseadas y libre de contaminación, su conservación es esencial. La criopreservación constituye un método eficaz de conservación de células que garantiza el mantenimiento de sus propiedades metabólicas iniciales (Hasegawa, 1996; Freshney, 2000b).

El daño celular inducido por el congelamiento y la descongelación es causado por la formación de cristales de hielo intracelulares y por efectos osmóticos (Hay, 1986). La adición de un agente crioprotector, como el glicerol o dimetil sulfóxido (DMSO) (Lovelock y Bishop, 1959) y el empleo de una velocidad lenta de enfriamiento, aproximadamente $1 \text{ }^\circ\text{C.min}^{-1}$ (Leibo y Mazur, 1971), minimizan dichos efectos.

La conservación de las líneas y clones celulares se realizó en nitrógeno líquido, ya que a temperaturas de $-196 \text{ }^\circ\text{C}$ se observan deterioros celulares mínimos (Green y col.,

1967). Se empleó una técnica de enfriamiento gradual desde temperatura ambiente hasta -196 °C.

Para ello, una vez realizado el recuento, suspensiones celulares en fase de crecimiento exponencial se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente en una centrífuga Eppendorf 5403, rotor 16A4-44. Se descartó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en una solución de SFB y DMSO (Sigma) en una relación 95:5 (V/V), de manera de obtener una concentración de $1-2 \cdot 10^6$ cél.ml⁻¹. La suspensión celular se distribuyó a razón de 1 ml por criotubo (Greiner) que luego fueron guardados en un contenedor apropiado, *MrFrosty* (Nalgene), y llevados a freezer de -70 °C por 24 h. Este dispositivo contiene alcohol isopropílico, permitiendo que en el interior del mismo la temperatura disminuya a razón de 1 °C.min⁻¹, de manera de lograr un enfriamiento gradual de las células que luego permita una correcta revitalización de las mismas.

Finalmente, los criotubos se almacenaron en termos de N₂ líquido a -196 °C.

5.10. 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 40 ml de medio de cultivo y se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Esta etapa se realizó con el objeto 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 y la viabilidad celular.

5.11. Producción de las variantes glicosiladas del hIFN- α 2b mediante el cultivo de clones en condiciones de adherencia

La producción de las diferentes muteínas de hIFN- α 2b a gran escala se realizó en condiciones de adherencia, empleando frascos T con una mayor superficie de sustrato que permita contener un mayor número de células. Para el caso de los clones de células CHO se emplearon frascos T triples que presentan una superficie de 500 cm². Para el caso de los clones de células HEK se emplearon frascos T de 175cm², debido a la necesidad de sensibilizar previamente la superficie con polilisina. Teniendo en cuenta que las células HEK demuestran una débil adherencia al soporte y se desprenden del sustrato una vez que alcanzan la confluencia, este paso inicial es fundamental para lograr que las células permanezcan adheridas a la superficie del frasco durante la etapa de producción. Para la etapa de producción estas células fueron cultivadas en soportes previamente sensibilizados

con polilisina (Poly-lysine, Sigma). Este reactivo permite incrementar la interacción electrostática entre los aniones presentes en la superficie celular y los cationes propios de los factores de adherencia presentes en los diferentes soportes de cultivo. El tratamiento de los soportes con polilisina consistió en la incubación durante 1 h a 37 °C y toda la noche a 4 °C con una solución de polilisina 5 µg.ml⁻¹ en agua estéril, respetando una relación de 175 µl de la solución mencionada por cada cm² de superficie.

En ambos casos las células se inocularon en una concentración de 200.000 cél.ml⁻¹ en el medio de cultivo de crecimiento correspondiente a cada línea celular (200 ml para frascos T triples y 50 ml para frascos T 175 cm²). Cuando las células alcanzaron la fase estacionaria, se cosechó el sobrenadante cada 48 o 72 h, reemplazándolo cada vez por el medio de cultivo correspondiente, suplementado con SFB 0,5% (V/V). Los sobrenadantes fueron centrifugados durante 10 min a 5000 rpm y conservados a -20 °C para su posterior purificación.

6. Purificación de las variantes glicosiladas del hIFN-α2b a partir de sobrenadantes de cultivo por cromatografía de inmunoafinidad

La cromatografía de inmunoafinidad fue introducida en 1968 por Cuatrecasas y col. y constituye una poderosa herramienta para el aislamiento de proteínas. Bajo las condiciones adecuadas, se pueden obtener factores de purificación entre 1000 y 5000 veces en un único paso.

La cromatografía de inmunoafinidad puede dividirse en tres etapas:

- Preparación de una matriz conteniendo el anticuerpo inmovilizado.
- Unión del antígeno a la matriz de anticuerpo.
- Elución del antígeno de la matriz.

6.1. Material de partida

Las muteínas del hIFN-α2b con cuatro sitios (IFN4N derivado de células CHO y HEK, IFN3NM47 e IFN2NM47/95), cinco sitios (IFN4NM47 e IFN3NM47/95) y seis sitios (IFN4NMutNter y IFN3N47MutNter) de N-glicosilación fueron obtenidas mediante el cultivo de sus correspondientes clones en condiciones de adherencia (sección 5.11).

Los sobrenadantes de cultivo fueron filtrados utilizando un sistema de filtración por vacío que emplea membranas de acetato de celulosa de 0,45 µm y 0,22 µm (Nalgene) y portafiltros de 500 y 1000 ml de capacidad (Nalgene).

6.2. Equipamiento

Se emplearon los cromatógrafos líquidos ÄKTA Basic y ÄKTA purifier (GE Healthcare) equipados con un sistema de bombas (P-900), un colector automático de

fracciones (FRAC-900), una unidad de detección de absorbancia (UV-900) y otra de pH y conductividad (PH/C-900).

6.3. Preparación de las matrices de inmunoafinidad

Para llevar a cabo la purificación de las diferentes variantes de hIFN- α 2b mediante cromatografía de inmunoafinidad, el mAb CA5E6 fue inmovilizado en una matriz de *Sepharose*TM (GE Healthcare). Para cada una de las variantes glicosiladas del hIFN- α 2b se prepararon 5 ml de matriz de inmunoafinidad.

6.3.1. Amplificación de hibridomas productores de mAbs anti-rhIFN- α 2b. Producción *in vivo* de líquido ascítico.

Para la producción del mAb CA5E6 en líquido ascítico se empleó un lote de 20 ratones BALB/c hembras de 4 meses de edad. La secuencia metodológica desarrollada para la obtención del líquido ascítico constó de las siguientes etapas:

- 1- Inoculación intraperitoneal de 0,5 ml de ácido 2,6,10,14-tetrametildecanoico (Pristane[®], Sigma), que actúa como sustancia irritante para el ratón, el que responde secretando nutrientes y reclutando monocitos y células linfoides en la zona peritoneal. De esta manera, se genera un ambiente muy favorable para la proliferación de las células tumorales (Harlow y Lane, 1988).
- 2- Preparación de las células de hibridomas a inocular. El hibridoma productor del mAb CA5E6 fue descongelado utilizando para su crecimiento una capa de células alimentadoras. Para la preparación de la misma, un ratón de la cepa BALB/c de 4 meses de edad se sacrificó por dislocación cervical y, en condiciones estériles, se extrajo el bazo. Se lavó con medio de cultivo D-MEM, se disgregó mediante el empleo de tijera y pinza de cirugía y se filtró por un tamiz de malla fina de acero número 50 (Sigma). El filtrado se centrifugó a 1000 rpm durante 10 min y, luego de descartar el sobrenadante, las células de bazo se resuspendieron en medio D-MEM suplementado con SFB 20% (V/V). Posteriormente, esta suspensión celular se dispuso en una placa de 12 pozos a razón de 1 ml por pozo. La descongelación de las células de hibridomas se realizó el día siguiente a la preparación de la capa de células alimentadoras.
- 3- Inoculación intraperitoneal de $2-5 \cdot 10^6$ células de hibridomas por animal, 10 días después de la administración de Pristane[®]. Para ello, el cultivo de hibridomas en fase de crecimiento exponencial fue centrifugado a 1000 rpm durante 10 min y resuspendido en 5 ml de PBS de manera de inocular 0,5 ml de suspensión celular por ratón.

- 4- El líquido ascítico fue recolectado, aproximadamente, a partir de la primera semana posterior a la inoculación de los hibridomas. Los criterios determinantes del inicio de la extracción de ascitis fueron la presencia de un abdomen prominente y la consecuente dificultad locomotriz manifestada por el animal. El líquido se obtuvo por punción de la región intraperitoneal con aguja de 0,9 mm de diámetro, recolectándolo por goteo en un tubo cónico de 50 ml.
- 5- El líquido ascítico fue centrifugado a 1500 rpm durante 10 min y el sobrenadante fue conservado a -20 °C.
- 6- La concentración de inmunoglobulinas (Igs) totales en el fluido ascítico se determinó mediante técnica de ELISA sándwich (sección 6.3.2).

6.3.2. Cuantificación de Igs totales

La cuantificación de Igs presentes en la ascitis murina y en las muestras purificadas se realizó por un procedimiento de ELISA sándwich, el cual se describe a continuación:

- 1- Sensibilización: placas de poliestireno de fondo plano de 96 pozos fueron sensibilizadas con 100 µl de una solución de anticuerpos de conejo anti-Igs murinas (DAKO) diluidas 1:2000 en solución de Na₂CO₃/NaHCO₃ 50 mM, pH 9,6 (solución de sensibilización). Se incubó durante 1 h a 37 °C y toda la noche a 4 °C.
- 2- Bloqueo: el bloqueo de los sitios de interacción inespecífica se realizó con 200 µl por pozo de solución de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma) 1% (P/V) en PBS (solución de bloqueo). Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 3- Primera incubación: en los pozos correspondientes se agregaron 100 µl de diluciones sucesivas 1:2 del estándar de IgG de ratón (Sigma) en solución de BSA 0,1% (P/V) en PBS con el agregado de Tween 20 (USB Corporation) 0,05% (V/V) (solución diluyente), desde 400 ng.ml⁻¹ hasta 0,39 ng.ml⁻¹. Las muestras se ensayaron realizando diluciones seriadas al medio, de manera de poder compararlas con el estándar en el rango de linealidad de la curva. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 4- Segunda incubación: se agregaron 100 µl de anticuerpos de conejo anti-Igs murinas conjugados con la enzima peroxidasa en una dilución 1:2000 en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 5- Reacción reveladora: el revelado se realizó mediante reacción enzimática empleando como sustrato H₂O₂ 0,015 volúmenes diluida en solución de citrato/fosfato de sodio 50 mM, pH 5,3, con el agregado de o-fenilendiamina (OPD, Sigma) en una concentración de 0,5 mg.ml⁻¹ (solución de revelado). Se agregaron 100 µl de solución de revelado por pozo y, luego de 15 min de

incubación en oscuridad a temperatura ambiente, la reacción se detuvo mediante el agregado de 50 μ l de H₂SO₄ 2N. La lectura del color generado se efectuó a una λ =492 nm en un lector de placas de microtitulación (Labsystems Multiskan MCC/340).

- 6- Control: se realizó un control sin Igs solubles, para evaluar la posible unión inespecífica de los reactivos. Para ello, durante la primera incubación, se reemplazó la muestra o el estándar por el agregado de 100 μ l de solución diluyente y se continuó con las siguientes etapas del ensayo.
- 7- Cuantificación: se graficaron los valores de absorbancia en función de las correspondientes concentraciones de IgG y de las diluciones en escala logarítmica para el estándar y las muestras, respectivamente. La concentración de las muestras se determinó utilizando el ensayo de rectas paralelas (Milano, 2001).

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

6.3.3. Purificación del mAb CA5E6

La purificación del mAb CA5E6 a partir del fluido ascítico se realizó mediante cromatografía de afinidad a proteína A de acuerdo con la siguiente metodología:

- 1- Armado de la columna: un volumen de 5 ml de gel de MabSelect Sure™ (GE Healthcare) se empaquetó en columna XK 16/20 (16 x 2 cm) (GE Healthcare).
- 2- Equilibrado: la matriz se equilibró con solución de Tris 1 M, NaCl 3 M, pH 9. Para esta etapa se emplearon 5 volúmenes de columna (VC), verificándose que el pH a la salida de la columna sea igual al de la solución de equilibrado.
- 3- Acondicionamiento de la muestra: el líquido ascítico se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min y el sobrenadante se ajustó a una concentración de NaCl 3 M, pH 9 mediante el agregado de NaCl sólido y solución de Tris 1 M pH 9 en una proporción volumétrica 10:1. Posteriormente, la muestra se filtró a través de una membrana de acetato de celulosa de 0,45 μ m mediante un sistema de vacío.
- 4- Siembra: la muestra se aplicó a la matriz teniendo en cuenta su capacidad y la concentración de Igs presentes en el fluido ascítico. Se respetó una relación de 10 mg de Igs por cada ml de gel.
- 5- Lavado 1: las proteínas no retenidas por la matriz cromatográfica fueron eliminadas mediante el lavado de la misma con solución de Tris 1 M, NaCl 3 M, pH 9, hasta demostrar la ausencia de proteínas por medición espectrofotométrica a λ =280 nm.

- 6- Elución: las Igs retenidas fueron eluidas mediante descenso del pH del lecho cromatográfico. Para tal fin, se empleó una solución de ácido cítrico 0,1 M, pH 3. Se recolectaron fracciones de 1 ml y se neutralizaron con 250 μ l de solución de Tris 1 M pH 8. Se mezclaron las fracciones correspondientes al pico de elución, las cuales fueron monitoreadas por lectura de absorbancia a $\lambda=280$ nm. El volumen total obtenido fue dializado contra solución de NaCl 0,5 M en NaHCO₃ 0,1 M, pH 8,3 con el objeto de acondicionar los anticuerpos para su acoplamiento a una matriz de *Sepharose*TM activada con bromuro de cianógeno.
- 7- Lavado 2: para eliminar los restos de Igs y otras proteínas que pudieran quedar retenidas en la columna, la misma se lavó con 3 VC de solución fosfato de sodio 20 mM, pH 7.
- 8- Lavado 3: Posteriormente, se lavó con 2,2 VC de solución de NaOH 0,1M, NaCl 1M.
- 9- Conservación: con el propósito de conservar la resina para usos posteriores, se empleó una solución de etanol 20% (v/v) en solución fosfato de sodio 20 mM, pH 7; conservándose a una temperatura entre 4-8 °C.

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

La concentración de Ig pura fue calculada mediante lectura espectrofotométrica a $\lambda=280$ nm utilizando un coeficiente de extinción porcentual ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) de 12,5, de acuerdo con la siguiente ecuación (Margni, 1996):

$$\text{Concentración de Ig (mg.ml}^{-1}\text{)} = 10 \times (E_{1\text{cm}}^{1\%})^{-1} \times A_{280\text{nm}} \quad (12)$$

La pureza de los anticuerpos se evaluó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) con posterior coloración con azul brillante de Coomassie (sección 7.3.1.1).

6.3.4. Inmovilización del mAb CA5E6

El mAb CA5E6 fue acoplado a una matriz de *Sepharose*TM 4B activada con bromuro de cianógeno (GE Healthcare), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. El porcentaje de acoplamiento del mAb a la resina se calculó por medida de la concentración de Igs en la solución antes y después de la reacción de acoplamiento.

La capacidad teórica de unión de las resinas se calculó teniendo en cuenta la masa de anticuerpo unido (porcentaje de acoplamiento), considerando que cada molécula de Ig (150 kDa) unida al soporte se ligará a una molécula de rhIFN- α 2b no glicosilado (19 kDa).

De esta manera, la capacidad teórica de la matriz se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Capacidad teórica de la matriz (mg IFN)} = \frac{\text{masa mAb (mg)} \times 19.000 \text{ mg.mmol}^{-1}}{150.000 \text{ mg.mmol}^{-1}} \quad (13)$$

Donde masa mAb es la masa de anticuerpo inmovilizado en la matriz (expresada en mg), calculada a partir de la eficiencia del acoplamiento.

6.4. Protocolo de purificación empleando la resina CA5E6-Sepharose

Antes de comenzar el protocolo de purificación, se llevó a cabo el acondicionamiento de la muestra con el fin de lograr la interacción apropiada entre la variante de IFN y el mAb y evitar posibles obstrucciones de la columna causadas por la presencia de restos celulares. El procedimiento consistió en el agregado de Tritón X-100 al sobrenadante de cultivo hasta alcanzar una concentración final de 0,3% (V/V) y el posterior ajuste del pH a un valor de 7,5 mediante el agregado de HCl o NaOH diluido, según fuese necesario. Finalmente, la muestra se filtró como se indica en el punto 6.1.

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

- 1- Equilibrado: la matriz se equilibró con 5 VC de solución de equilibrado (Tris 25 mM; Tritón X-100 0,3% (V/V); pH 7,5) a un flujo de 1 ml.min⁻¹ (0,5 cm.min⁻¹).
- 2- Siembra: se sembró un volumen de muestra acondicionada, a un flujo lineal aproximado de 0,6 cm.min⁻¹ (flujo volumétrico de 1,2 ml.min⁻¹). El *flowthrough* (FT) se recolectó para su posterior análisis.
- 3- Lavado 1: la matriz se lavó con 5 VC de una solución de Tris 25 mM, pH 7,5; NaCl 0,5 M; Tritón X-100 0,2% (V/V).
- 4- Lavado 2: la matriz se lavó con 5 VC de una solución de NaCl 0,15 M. Cada lavado se recogió para su posterior análisis. El flujo aplicado durante las etapas de los lavados fue igual al empleado durante la fase de equilibrado.
- 5- Elución: la variante de IFN fue eluida por descenso de pH. Para tal fin, se emplearon 5 VC de una solución de glicina 100 mM, pH 2; trabajando al mismo flujo utilizado durante la etapa de equilibrado. Se recolectaron fracciones, las cuales fueron neutralizadas con solución de Tris 1 M, pH 8.

Todas las fracciones se conservaron a -20 °C para su posterior análisis.

- 6- Conservación de la matriz: la matriz se lavó con 5 VC de solución de conservación [Tris/HCl 0,1M; azida sódica 0,02% (p/v); pH 7] y se guardó a 4 °C hasta su reutilización.

Todas las fracciones recolectadas durante el proceso de purificación (siembra, *FT*, lavados y elución) fueron analizadas mediante técnica de ELISA sándwich (sección 7.2.1.). Para determinar el éxito de la purificación se calculó el rendimiento o recuperación (R) utilizando la ecuación 14, donde MF representa la masa de proteína de interés recuperada en el proceso y MI, la masa inicial presente en la muestra.

$$R(\%) = \frac{MF}{MI} \times 100 \quad (14)$$

6.5. Concentración y diafiltración de la proteína

Las fracciones correspondientes al pico de elución de cada proceso de purificación se mezclaron, concentraron y diafiltraron contra PBS. Para ello, se utilizaron dispositivos de ultrafiltración con una membrana de 10 kDa (Amicon® Ultra-15 y Amicon® Ultra-4, Millipore).

Una vez diafiltradas, las muestras purificadas se analizaron mediante lectura espectrofotométrica a $\lambda=280$ nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop 2000c (Thermo Scientific). Para el cálculo de la concentración de IFN se consideró un coeficiente de absortividad para hIFN- $\alpha 2b$ de $0,924 \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ de acuerdo con la ecuación 15, donde A corresponde a la absorbancia a $\lambda=280$ nm para la muestra o para el blanco de reactivos y L corresponde a la longitud del paso óptico (1 cm).

$$C(\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}) = \frac{A_{\text{muestra}} - A_{\text{blanco}}}{0,924 (\text{ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) \times L (\text{cm})} \quad (15)$$

La pureza de las variantes se evaluó mediante SDS-PAGE con posterior coloración con azul brillante de Coomassie (sección 7.3.1.1).

7. Caracterización fisicoquímica de las muteínas del hIFN- $\alpha 2b$

7.1. Obtención de los reactivos necesarios para el desarrollo de los distintos enzimoimmunoensayos (ELISA) necesarios para la cuantificación de las muteínas

Para la cuantificación de las diferentes variantes de IFN presente en los sobrenadantes de cultivo y en las distintas etapas del proceso de purificación, se empleó el mAb CA5E6 evaluado previamente en el laboratorio (Ceaglio, 2008). El mismo fue producido (sección 6.3.1) y purificado a partir de ascitis murina (sección 6.3.3). El anticuerpo mencionado fue seleccionado a partir de un panel de 11 mAbs anti-rhIFN- $\alpha 2b$ obtenido durante la tesina desarrollada por el Lic. Pablo Casalis (Casalis, 2004). Además, se empleó un suero policlonal (pAb) de conejo anti-rhIFN- $\alpha 2b$ (pAb C7). Todos los reactivos, disponibles en el laboratorio, fueron obtenidos empleando el hIFN- $\alpha 2b$ de origen bacteriano

como inmunógeno. Se emplearon dos diseños diferentes de ELISAs: ELISA sándwich y ELISA de competición.

7.2. Cuantificación de las muteínas del hIFN- α 2b mediante ELISA

7.2.1. ELISA sándwich

Este ensayo se basa en la captura del hIFN- α 2b por parte del mAb CA5E6 inmovilizado sobre placas de poliestireno. Posteriormente, el hIFN- α 2b es reconocido por las Igs presentes en el suero de conejo (pAb C7). Éstas, a su vez, reaccionarán con un segundo anticuerpo (anti-Igs de conejo) conjugado con una enzima, que catalizará, *a posteriori*, la transformación de un sustrato incoloro en una sustancia coloreada.

Metodología:

- 1- Sensibilización: placas de poliestireno de fondo plano de 96 pozos (Greiner) fueron sensibilizadas con 100 μ l del mAb CA5E6 1 μ g.ml⁻¹ (100 ng por pozo) diluido en solución de sensibilización. Se incubó durante 1 h a 37 °C y toda la noche a 4 °C.
- 2- Bloqueo: el bloqueo de los sitios de interacción inespecífica se realizó con 200 μ l por pozo de solución de bloqueo. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 3- Primera incubación: se agregaron 100 μ l de diluciones sucesivas 1:2 del estándar de rhIFN- α 2b de origen bacteriano (Gema Biotech) desde 10 ng.ml⁻¹ hasta 9,8.10⁻³ ng.ml⁻¹, o de las muestras a analizar, en solución diluyente. Las muestras se ensayaron realizando diluciones de manera de poder compararlas con el estándar en el rango de linealidad de la curva. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 4- Segunda incubación: se adicionaron 100 μ l de pAb C7 en una dilución 1:1000 preparada en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 5- Tercera incubación: se agregaron 100 μ l de anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo conjugados con la enzima peroxidasa (DAKO) en una dilución 1:2000 en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 6- Reacción reveladora: se repitió el procedimiento indicado en la sección 6.3.2.
- 7- Control: se realizó el control negativo, sin Ag soluble, para evaluar la posible unión inespecífica de los reactivos. Para ello, durante la primera incubación, se reemplazó la muestra o el estándar por el agregado de 100 μ l de solución diluyente y se continuó con las siguientes etapas del ensayo.
- 8- Cuantificación: se realizó según lo indicado en la sección 6.3.2.

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

7.2.2. ELISA de competición

Este ensayo se basa en la competición entre un Ag inmovilizado en fase sólida con el mismo Ag en fase líquida por su unión a un mAb en solución. Posteriormente, se agrega un segundo anticuerpo (anti-especie murina) conjugado con una enzima que catalizará la transformación de su sustrato incoloro en una sustancia coloreada. Como Ag inmovilizado se utilizó el rhIFN- α 2b no glicosilado. Como anticuerpo para realizar la competición se empleó el mAb CA5E6.

Metodología:

- 1- Sensibilización: placas de poliestireno de fondo plano de 96 pozos fueron sensibilizadas con 100 μ l de rhIFN- α 2b no glicosilado en una concentración de 0,5 μ g. ml^{-1} (50 ng por pozo) en solución de sensibilización. Se incubó durante 1 h a 37°C y toda la noche a 4 °C.
- 2- Bloqueo: el bloqueo de los sitios de interacción inespecífica se realizó con 200 μ l por pozo de solución de bloqueo. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 3- Competición *in situ*: se agregaron 50 μ l de diluciones sucesivas 1:2 del estándar de hIFN- α 2b desde 1 μ g. ml^{-1} hasta 4,9.10⁻³ μ g. ml^{-1} y de las muestras en solución diluyente. Las muestras se ensayaron realizando diluciones seriadas al medio, de manera de poder compararlas con el estándar en el rango de linealidad de la curva. Posteriormente, se adicionaron 50 μ l de solución del mAb CA5E6 a cada pozo de la placa de microtitulación, utilizando una dilución apropiada del mismo. Se utilizó aquella dilución de Ac que proporcionó una señal colorimétrica correspondiente al 50% de la máxima absorbancia alcanzada en ensayos de titulación mediante técnica de ELISA específico indirecto realizado previamente. La reacción de competición se llevó a cabo durante 1 h a 37 °C.
- 4- Segunda incubación: se agregaron 100 μ l de anticuerpos de conejo anti-Igs murinas conjugados con la enzima peroxidasa en una dilución 1:1000 en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37 °C.
- 5- Reacción reveladora: se repitió el procedimiento indicado en 6.3.2.
- 6- Controles: se realizaron dos tipos de controles:
 - Se evaluó el 100% de unión del Ac al Ag inmovilizado en la placa de microtitulación, en ausencia de Ag soluble. Para ello, durante la etapa de competición *in situ*, se reemplazó el estándar y/o la muestra por el agregado de 50 μ l de solución diluyente y, posteriormente, se adicionaron 50 μ l de la solución de Ac. Luego se continuó con las siguientes etapas del ensayo.
 - Control negativo en ausencia de Ag soluble y de Ac. Para ello, durante la etapa de competición *in situ*, se adicionaron 100 μ l de solución diluyente en lugar de Ag competidor y Ac, continuando con las etapas posteriores del ensayo.

7- Cuantificación: se realizó según lo indicado en 6.3.2.

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

7.3. Identificación y análisis de glicofomas de las nuevas variantes glicosiladas del hIFN- α 2b

7.3.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La masa molecular aparente y el patrón de isoformas de las nuevas variantes de hIFN- α 2b fueron evaluados mediante ensayos de SDS-PAGE. Esta metodología permite llevar a cabo la separación electroforética de las proteínas. Posteriormente, la detección de la proteína en estudio se realizó de manera diferente según se tratase de una muestra pura o impura (como es el caso de los sobrenadantes de cultivo) y de su concentración. Para las muestras purificadas la detección se realizó mediante tinción específica de las proteínas utilizando el colorante azul brillante de *Coomasie*. Para las muestras correspondientes a sobrenadantes de cultivo se llevó a cabo un ensayo de *western blot (wb)* mediante la electrotransferencia de las proteínas a una membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF) e identificación de las moléculas transferidas por interacción con anticuerpos específicos.

La electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) se desarrolló siguiendo esencialmente el método descrito por Laemmli (1970), utilizando para el armado de los geles el sistema de electroforesis modular vertical Mini-Protean 3 (Bio-Rad). Todos los geles fueron realizados en condiciones desnaturizantes, agregando el detergente iónico dodecil sulfato de sodio, SDS (SDS-PAGE), en presencia de un agente reductor de enlaces disulfuro (β -mercaptoetanol). Para ello, se utilizó un gel de apilamiento con una concentración de acrilamida/bisacrilamida del 5% (P/V) y un gel de separación con una concentración de acrilamida/bisacrilamida del 15% (P/V). Tanto las muestras como los marcadores de masa molecular (1610317 y Dual Color 1610374, Bio-Rad) se prepararon con una solución de Tris-HCl 50 mM, SDS 2% (P/V), glicerol 10% (V/V), β -mercaptoetanol 5% (V/V), azul de bromofenol 0,05% (P/V), pH 6,8 (solución de siembra) en proporción 3:1. Las muestras fueron incubadas a 100 °C durante 5 min para favorecer la desnaturización de las moléculas y sembradas directamente sobre el gel de apilamiento. La corrida electroforética se llevó a cabo empleando solución de corrida [Tris 25 mM, glicina 0,2 M; SDS 0,1% (V/V)], a un voltaje constante de 200 V, sumergiendo el módulo en baño de hielo. La corrida finalizó cuando el frente de corrida alcanzó 0,5 cm del borde inferior del gel de separación.

7.3.1.1. Detección mediante coloración con azul brillante de *Coomasie*

Para el análisis de las muestras purificadas, el gel se sumergió durante 10 min en solución de coloración [azul brillante Coomassie 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. Este protocolo permitió no sólo evaluar la masa molecular aparente de las muteínas del hIFN- α 2b, sino también evaluar el grado de pureza de las muestras purificadas. Para ello, una vez identificadas las impurezas de la muestra, se realizó una densitometría de las bandas coloreadas empleando un escáner para densitometría (Image Scanner, GE Healthcare) y el *software* Image Master Total Lab V1.11 (GE Healthcare).

7.3.1.2. Detección inmunoquímica (*western blot*)

Para analizar muestras correspondientes a sobrenadantes de cultivo, luego de la electroforesis se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF (Bio-Rad), empleando el mismo equipo de Bio-Rad (transferencia sumergida). Se utilizó un protocolo estándar de transferencia de proteínas (Hames, 1990), empleando como solución de transferencia Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8,3, metanol 20% (V/V), a intensidad de corriente constante de 180 mA durante 1 h, refrigerando el dispositivo en todo momento. Posteriormente, se llevó a cabo la detección inmunoquímica de los derivados del hIFN- α 2b como se describe a continuación:

- 1- Bloqueo: los sitios de la membrana de PVDF sin proteínas adsorbidas fueron bloqueados por inmersión de la misma en solución de leche descremada 5% (P/V) en buffer TBS (Tris-HCl 50 mM; NaCl 150 mM; pH 7,5) con el agregado de Tween 20 al 0,05% (V/V). Se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con agitación.
- 2- Primera incubación: la membrana de PVDF se incubó con una solución de Igs de conejo anti-rhIFN- α 2b (pAb C7) en una dilución 1:2000 preparada con solución diluyente de *wb* [leche descremada 0,5% (P/V) en TBS-Tween 20 al 0,05% (V/V)]. Se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con agitación.
- 3- Segunda incubación: la membrana se incubó con anticuerpos de cabra anti-Igs de conejo conjugados con la enzima peroxidasa en una dilución 1:2000 en solución diluyente de *wb*. Se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación.
- 4- Revelado: se empleó el kit de quimioluminiscencia Quimioluminisce SuperSignal@West (Pierce), siguiendo las indicaciones del fabricante. La membrana se incubó con el reactivo durante 1 min a temperatura ambiente, se escurrió y se colocó en un soporte de acrílico cubriéndola con un nylon para

evitar el contacto del sustrato con la película reveladora. Finalmente, la membrana fue expuesta a una película fotográfica Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare) en un cuarto oscuro durante 1,5-2 min. El revelado de la película fotográfica se efectuó en forma manual empleando el método convencional de revelado y fijación (Reforzador y Fijador GBX, Kodak).

Luego de cada etapa se realizaron tres lavados, los cuales consistieron en sumergir la membrana de PVDF en solución de TBS-Tween 20 al 0,05% (V/V) durante 5 min con agitación.

7.3.2. Isoelectroenfoque (IEF)

El análisis de las isoformas de diferente pI de las moléculas se realizó mediante focalización isoeléctrica, utilizando un sistema de GE Healthcare compuesto por una cuba de electroforesis (Multiphor II), un baño refrigerante (Multitemp III) y una fuente de poder (EPS3500XL). Esta metodología fue empleada para evaluar muestras purificadas y muestras correspondientes a sobrenadantes de cultivo, es por esto que, al igual que para la metodología anterior, la detección se realizó de acuerdo a las características de las muestras analizadas.

La técnica de isoelectroenfoque se llevó a cabo en geles de 0,5 mm de espesor, con una concentración de acrilamida/bisacrilamida del 8% (P/V) con el agregado de urea 7 M. Para obtener el rango de pH deseado se empleó una mezcla de anfólitos con un rango de pI 2,9-4,9 (Pharmalyte, GE Healthcare). Una vez preparado el soporte electroforético, se realizó el preenfocado de los anfólitos durante 1 h a 10 W, 2000 V y 100 mA con el fin de generar el gradiente de pH. Posteriormente, se sembraron 20 µl de las muestras a una distancia de 1 cm desde el cátodo. El enfocado se realizó durante 40 min, empleando las mismas condiciones indicadas en la etapa de preenfocado. Es importante tener en cuenta que para muestras correspondientes a sobrenadantes de cultivo previamente se llevó a cabo el desalado, concentración y diafiltración de las mismas con agua ultrapura. Para ello, se utilizó una membrana de ultrafiltración de 10 kDa, Amicon® Ultra-4 (Millipore).

7.3.2.1 Detección mediante coloración con azul brillante de *Coomasie* coloidal

Cuando el procedimiento de IEF se llevó a cabo sembrando muestras puras, el gel fue sometido a coloración empleando azul brillante de *Coomasie* coloidal, el cual se incubó durante 30 min. Posteriormente se procedió a lavar el gel con agua destilada para retirar el exceso de colorante.

7.3.2.2 Detección inmunoquímica (*western blot*)

Cuando el procedimiento de IEF se llevó a cabo sembrando muestras impuras y al igual que lo descrito para la metodología de SDS-PAGE, los componentes separados fueron transferidos a membranas de PVDF, utilizando la unidad de transferencia electroforética horizontal Multiphor II Nova Blot (GE Healthcare). La transferencia se llevó a cabo durante 1 h a 2000 V, 10 W y una intensidad de corriente de 150 mA, empleando la misma solución de transferencia utilizada en los ensayos de *western blot* (sección 7.3.1.2). La detección inmunoquímica de las isoformas de las variantes del hIFN- α 2b transferidas a las membranas se realizó siguiendo el protocolo descrito para los ensayos de *wb* (sección 7.3.1.2).

8. Caracterización biológica *in vitro* de las muteínas del hIFN- α 2b

Los ensayos de valoración biológica de citoquinas pueden realizarse de diversas formas, pero todas ellas se basan en la capacidad de la proteína de inducir alguna actividad cuantificable en células o tejidos (Mire-Sluis, 1999).

Los ensayos más utilizados para la medición de la potencia biológica de los IFN se basan en su actividad antiviral. Sin embargo, estos ensayos no predicen la actividad biológica de los mismos en terapias antitumorales o inmunomoduladoras. Por lo tanto, se han desarrollado bioensayos basados en la inhibición de la proliferación celular, en la regulación de funciones celulares y en la detección de la expresión de proteínas inducidas por IFN mediante inmunoensayos (Mire-Sluis y col., 1996; Meager, 2002).

8.1. Valoración de la actividad biológica antiviral

Los ensayos de valoración biológica antiviral de los IFN cuantifican la actividad inhibitoria que ejercen estas citoquinas sobre la propagación o replicación viral. El procedimiento más simple y conveniente consiste en medir la capacidad del IFN de proteger a las células susceptibles del efecto citopático de un virus lítico para un rango de concentraciones de IFN.

Existe una gran variedad de sistemas línea celular/virus; en el presente trabajo se ensayó el sistema: línea celular MDBK/VSV. El procedimiento básico consiste en sembrar un determinado número de células de manera de formar una monocapa e incubarlas con diluciones seriadas de IFN- α para inducir el estado antiviral. Posteriormente, las células son expuestas al virus citopático hasta observar el máximo efecto citolítico en las células no tratadas con IFN. En este momento, las células que no han sido lisadas y, por lo tanto, permanecen adheridas al sustrato, son fijadas y coloreadas. Finalmente, el colorante incorporado por las células es disuelto, procediéndose a su medición espectrofotométrica.

Para realizar el ensayo, el cual se puso a punto previamente en nuestro laboratorio (Ceaglio, 2008), se utilizó el estándar internacional de la OMS para el hIFN- α 2b producido en *E. coli* obtenido del *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC 95/566) siguiendo la metodología que se detalla a continuación:

- 1- La línea celular MDBK fue cultivada en medio de crecimiento. Cuando el cultivo se encontraba en fase de crecimiento exponencial, las células se cosecharon, se contaron y se resuspendieron de manera de obtener una densidad celular de $2,5 \cdot 10^5$ cél.ml⁻¹. Se sembraron 100 μ l de esta suspensión celular en cada cavidad de una placa de cultivo estéril de 96 pozos ($2,5 \cdot 10^4$ células por pozo) y se incubó durante 24 h a 37 °C.
- 2- Se eliminó el sobrenadante por inversión de la placa, se escurrió y se colocaron 100 μ l por pozo de sucesivas diluciones 1:2 del estándar del hIFN- α 2b en medio MEM suplementado con SFB 2% (V/V) (medio de ensayo), desde una concentración de actividad de 20 UI.ml⁻¹ hasta $1,6 \cdot 10^{-1}$ UI.ml⁻¹, incubándose durante 6 h.
- 3- Se eliminó nuevamente el sobrenadante por inversión de la placa y se realizaron dos lavados con 100 μ l de medio de ensayo. Finalmente, se escurrió y se colocaron 100 μ l de una dilución apropiada del virus VSV en medio de ensayo en cada cavidad, incubándose durante 24 h.
- 4- Para revelar el ensayo, se eliminó el sobrenadante de cultivo por inversión de la placa, se escurrió y se adicionaron 50 μ l por pozo de una solución de cristal violeta (Anedra) 0,75% (P/V) en metanol 40% (V/V), incubándose durante 15 min a 37 °C. Posteriormente, se eliminó el colorante y se realizaron lavados con agua destilada hasta verificar ausencia del colorante en los lavados. Para disolver el colorante fijado, se agregaron 250 μ l de ácido acético 20% (V/V) en cada cavidad y se homogeneizó. La lectura del color generado se efectuó a una $\lambda=540$ nm en un lector de placas de microtitulación.
- 5- Se realizaron dos tipos de controles por triplicado:
 - En ausencia de IFN y de virus, para evaluar la máxima proliferación celular cuando no se produce infección viral. Para ello, se reemplazaron los 100 μ l de la dilución del rhIFN- α 2b y los 100 μ l de la dilución del virus por 100 μ l de medio de ensayo.
 - En ausencia de IFN, para evaluar el efecto del virus sobre las células (control de lisis). Para ello, se adicionaron 100 μ l de medio de ensayo en lugar de la dilución del rhIFN- α 2b.
- 6- Se graficaron los valores de absorbancia en función de las correspondientes concentraciones de actividad del hIFN- α 2b y de las diluciones de las muestras

en escala logarítmica, respectivamente. La actividad biológica (AB) de las muteínas se determinó mediante comparación con el estándar utilizando el ensayo de rectas paralelas.

8.2. Valoración de la actividad biológica antiproliferativa

El ensayo de valoración de la actividad biológica antiproliferativa *in vitro* del hIFN- α 2b se basa en la cuantificación de los efectos que esta citoquina induce sobre la viabilidad y proliferación de la línea celular Daudi.

El procedimiento básico consiste en sembrar un determinado número de células Daudi en placas de microtitulación e incubarlas con diluciones seriadas del hIFN- α 2b durante un determinado tiempo. Posteriormente, mediante un método colorimétrico se mide la proliferación celular, poniendo en evidencia la presencia de enzimas deshidrogenasas que se encuentran en las células metabólicamente activas y cuya actividad se relaciona en forma directa con la cantidad de células viables presentes en el cultivo (Nederman y col., 1990). Con este fin, se empleó 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-carboximetoxi-fenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium] 2 mg.ml⁻¹.
- **PMS** [metasulfato de fenazina] 0,92 mg.ml⁻¹.

Las enzimas deshidrogenasas catalizan la reducción del MTS en un cromógeno soluble (azul de formazán) que absorbe a una longitud de onda de 490 nm. El PMS actúa como dador de electrones en la reacción de óxido-reducción. La cantidad de producto generado es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas en el cultivo.

Las condiciones del bioensayo se optimizaron previamente en el laboratorio, utilizando el estándar internacional de la OMS para el hIFN- α 2b producido en *E. coli* (NIBSC 95/566).

El estándar, las muestras y los controles se procesaron por triplicado, utilizando el protocolo que se describe a continuación:

- 1- En placas estériles de fondo plano de 96 cavidades se colocaron 50 μ l por pozo de sucesivas diluciones 1:2 del estándar de rhIFN- α 2b en medio RPMI suplementado con SFB 10% (V/V), desde una concentración de actividad de 100 UI.ml⁻¹ hasta 0,78 UI.ml⁻¹. Las muestras se ensayaron en iguales condiciones, realizando una dilución inicial adecuada que permitió compararlas con el estándar en el rango de linealidad de la curva dosis-respuesta.
- 2- La línea celular Daudi fue cultivada en medio RPMI suplementado con SFB 10% (V/V). Cuando la suspensión celular se encontraba en fase de crecimiento

exponencial, las células se cosecharon y se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en el mismo medio de cultivo, preparando una suspensión de $1 \cdot 10^5$ cél.ml⁻¹.

3- Posteriormente, se adicionaron 50 µl de suspensión celular en cada cavidad ($5 \cdot 10^3$ células por pozo), incubándose durante 96 h en estufa a 37 °C.

4- Transcurrido el tiempo de incubación, se agregaron 20 µl por cavidad del reactivo de color, preparado en el momento mezclando 2 ml de solución de MTS con 100 µl de solución de PMS por cada placa. Se incubó durante 5 h a 37 °C. La absorbancia del cromógeno se midió a una $\lambda=492$ nm contra lectura de fondo de placa a $\lambda=690$ nm.

5- Se realizaron dos tipos de controles:

- Para evaluar la máxima proliferación celular en ausencia de hIFN- α 2b. Para ello, se reemplazaron los 50 µl de la dilución de rhIFN- α 2b por 50 µl de medio RPMI suplementado con SFB 10% (V/V) y se adicionaron 50 µl de la suspensión celular.
- Para evaluar los reactivos utilizados durante el desarrollo de la reacción colorimétrica. Para ello, se reemplazaron los 50 µl de la dilución de hIFN- α 2b y los 50 µl de suspensión celular por 100 µl de medio RPMI suplementado con SFB 10% (V/V).

6- Se graficaron los valores de absorbancia en función de las correspondientes concentraciones de actividad del hIFN- α 2b y de las diluciones de las muestras en escala logarítmica, respectivamente. La concentración de actividad de las muestras se determinó mediante comparación con el estándar utilizando el ensayo de rectas paralelas.

8.3. Análisis de la actividad biológica antiproliferativa *in vitro* de las variantes del hIFN- α 2b en líneas celulares derivadas de tumores sólidos

La capacidad antiproliferativa del IFN4N derivado de células CHO y HEK (IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK}, respectivamente) fue evaluada en diferentes líneas celulares derivadas de tumores sólidos de origen humano. Para este análisis se emplearon las líneas celulares PC-3, A375 y ACHN, derivadas de cáncer de próstata, melanoma maligno y carcinoma renal, respectivamente. Para el diseño de estos ensayos fue importante considerar que estas líneas celulares presentan una menor sensibilidad frente al hIFN- α 2b respecto de las células Daudi, la cual es causada por una menor densidad de receptores celulares específicos. Por este motivo, se emplearon concentraciones de hIFN- α 2b mayores para iniciar las curvas dosis-respuesta.

Para este experimento las muestras y controles fueron procesados por triplicado y evaluados frente a cada línea celular. Se empleó el protocolo que se describe a continuación:

- 1- En placas estériles de fondo plano de 96 cavidades se colocaron 50 μl por pozo de sucesivas diluciones 1:2 de las variantes IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} en el medio de crecimiento correspondiente para cada línea celular, desde una concentración de 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ hasta $9,8\cdot 10^{-3}$ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Ambas muestras fueron ensayadas en iguales condiciones. Se preparó una placa para cada línea celular.
- 2- Las líneas celulares fueron cultivadas en su medio de cultivo de crecimiento. Cuando se encontraban en fase de crecimiento exponencial, las células se cosecharon, se contaron y se resuspendieron de manera de obtener una densidad celular de $4\cdot 10^4$ cél. ml^{-1} . Se sembraron 50 μl de esta suspensión celular en cada cavidad de una placa de cultivo estéril de 96 pozos ($2\cdot 10^3$ células por pozo) y se incubó durante 96 h en estufa a 37 °C.
- 3- Transcurrido el tiempo de incubación, se agregaron 20 μl por cavidad del reactivo de color, preparado en el momento mezclando 2 ml de solución de MTS con 100 μl de solución de PMS por cada placa. Se incubó durante 3 h a 37 °C. La absorbancia del cromógeno se midió a una $\lambda=492$ nm contra lectura de fondo de placa a $\lambda=690$ nm.
- 4- Se realizó un control de máxima proliferación celular en ausencia de hIFN- $\alpha 2\text{b}$. Para ello, se reemplazaron los 50 μl de la dilución de hIFN- $\alpha 2\text{b}$ por 50 μl de medio de crecimiento y se adicionaron 50 μl de la suspensión celular.
- 5- Se graficaron los valores de absorbancia en función de las correspondientes concentraciones del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} en escala logarítmica. Se calcularon las concentraciones de IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} necesarias para inhibir el crecimiento celular en un 50% (IC50) teniendo en cuenta el control de máxima proliferación. Debido a la necesidad de emplear elevadas cantidades de proteína en estos ensayos, decidimos no utilizar estándares internacionales que permiten valorar las muestras, sino que sólo se calculó comparativamente la concentración de IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} necesaria para lograr inhibir el crecimiento celular en un 50%.

9. Análisis de la glicosilación de las variantes del hIFN- $\alpha 2\text{b}$

9.1. Cuantificación de ácido siálico

Los ácidos siálicos comprenden una gran familia de ácidos neuramínicos, siendo Neu5Ac y Neu5Gc los más abundantes. Ocupan la posición terminal de los glicanos de

muchas glicoproteínas de mamíferos y ejercen una gran influencia sobre las propiedades farmacocinéticas de las mismas.

La cuantificación de Neu5Ac y Neu5Gc en muestras de las diferentes variantes de IFN purificadas se realizó mediante cromatografía de intercambio iónico a pH elevado con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD), empleando el sistema DIONEX ICS-5000 equipado con una columna CarboPac™ 246 PA20 (Thermo Scientific Dionex). Este tipo de cromatografía es utilizada para separar analitos aniónicos o que pueden ionizarse en condiciones de pH elevado. La separación se produce en columnas compuestas por partículas de poliestireno divinilbenceno unidas electrostáticamente a microesferas que contienen grupos funcionales intercambiadores de aniones. Se utilizaron como fases móviles NaOH 100 mM y AcONa 500 mM / NaOH 100 mM. Este método tiene la ventaja de detectar ambas especies de ácido siálico sin derivatización previa de la muestra.

La identificación y cuantificación de Neu5Ac y Neu5Gc en las muestras fue realizada utilizando estándares comerciales de Neu5Ac y Neu5Gc (Calbiochem), construyéndose una curva de calibrado desde 6,25 a 500 pmol y desde 0,2 a 100 pmol, respectivamente.

Los ácidos siálicos fueron escindidos de las glicoproteínas mediante hidrólisis ácida. Para ello, en primer lugar se llevaron a sequedad 20 µg de proteína usando un concentrador (Concentrator Plus, Eppendorf). Posteriormente la proteína se resuspendió en 200 µl HCl 0,1 M, incubándose a 80 °C durante 1 h. Luego, la muestra fue llevada nuevamente a sequedad y finalmente resuspendida en 40 µl de agua ultra pura, inyectándose diferentes cantidades a los fines de cuantificar correctamente ambos tipos de ácidos siálicos.

9.2. Cuantificación de monosacáridos

El análisis de la composición de monosacáridos permite determinar la cantidad y el tipo de monosacáridos presentes en una muestra. Generalmente, se emplea como técnica complementaria a otros métodos que permiten llevar a cabo, en conjunto, un análisis estructural detallado de los glicanos provenientes de la glicoproteína en estudio.

La cuantificación de Gal, Man, Fuc, GalNAc y GlcNAc en muestras purificadas se realizó mediante HPAEC-PAD, empleando el sistema DIONEX ICS-5000 equipado con una columna CarboPac™ 246 PA20. Se utilizaron como fases móviles NaOH 200 mM y agua ultra pura.

Los diferentes monosacáridos presentes en las muestras fueron identificados y cuantificados utilizando un estándar comercial que contiene 10 nmol de cada monosacárido (CM-Mono-Mix-10, Ludger). Para escindir tanto los monosacáridos neutros como los aminados, el estándar y las muestras fueron sometidos a dos tipos diferentes de hidrólisis

ácidas. La hidrólisis con TFA 2 M permitió liberar y analizar monosacáridos neutros (Gal, Man y Fuc), mientras que la hidrólisis con HCl 6 M se empleó para el análisis de monosacáridos aminados (GalNAc y GlcNAc). El procedimiento de hidrólisis fue similar al descrito para la cuantificación de ácidos siálicos, realizándose la incubación de las muestras durante 3 h a 100 °C.

Las curvas de calibrado para ambos tipos de hidrólisis fueron construidas desde 0,4 a 0,0125 nmol de cada uno de los monosacáridos. Se inyectaron diferentes cantidades de muestra de manera de cuantificar adecuadamente todos los monosacáridos presentes en las mismas.

9.3. N-deglicosilación enzimática

Para confirmar la presencia de N-glicanos unidos a las diferentes proteínas, las muestras purificadas se sometieron a una reacción de N-deglicosilación enzimática, utilizando el *kit* PNGasa F (Biolabs Inc.). Con este fin, se incubaron 20 µg de proteína con 2 µl de buffer de desnaturalización 10 X [(SDS 5% (P/V), β-mercaptoetanol 10% (V/V)] durante 10 min a 100 °C. Posteriormente, se adicionó 1/10 de volumen de buffer G7 (fosfato de sodio 0,5 M, pH 7,5) y 1/10 de volumen del detergente NP-40 10% (V/V). Finalmente, se agregaron 15 U de PNGasa F y se incubó durante toda la noche a 37 °C.

Para el análisis de N-glicanos mediante técnicas cromatográficas se llevó a cabo la digestión de 150 µg de proteína purificada, aumentando el número de tubos empleados y respetando los volúmenes indicados para cada uno de ellos.

Las muestras obtenidas fueron analizadas en geles SDS-PAGE, seguidos de tinción con azul brillante de *Coomassie*. La digestión completa de las variantes N-glicosiladas fue verificada mediante comparación con la variante IFNwt.

9.4. Marcación de los N-glicanos con el fluoróforo 2-AB

Los N-glicanos provenientes de la digestión con PNGasa F fueron purificados mediante precipitación etanólica. Para ello, se adicionaron 300 µl de etanol absoluto frío a la mezcla proveniente de la digestión, incubándose a -70 °C durante 1 h. Seguidamente, las muestras fueron centrifugadas durante 10 min a 10000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y el *pellet* fue lavado con 100 µl de etanol 70% (V/V) frío. Luego de centrifugar nuevamente bajo las mismas condiciones, el sobrenadante fue recuperado junto con el anterior, descartándose el *pellet*.

El sobrenadante conteniendo los N-glicanos fue llevado a sequedad y posteriormente marcado con el fluoróforo 2-AB (Sigma). Para ello, se adicionaron 5 µl de una solución conteniendo 0,0576 g de 2-AB en 1200 µl de una mezcla 7:3 de DMSO:ácido acético. La marcación se llevó a cabo durante 2 h en baño de agua a 65 °C. Transcurrido

este tiempo, los N-glicanos fueron purificados del exceso de 2-AB mediante cromatografía ascendente. Para ello, las muestras fueron sembradas en el extremo de papeles Whatman de 3 x 15 cm previamente lavados 3 veces con agua ultra pura. Posteriormente, los papeles fueron sumergidos en acetonitrilo (ACN) sin tocar el punto de siembra. El ACN asciende por capilaridad a través del papel arrastrando el exceso de 2-AB. Una vez culminado el proceso cromatográfico, los N-glicanos marcados fueron eluidos desde el papel empleando 1,5 ml de agua ultra pura y posteriormente filtrados empleando filtros para jeringa de PVDF 0,45 μm (Millipore). Finalmente, las muestras fueron llevadas a un volumen final de 40 μl en concentrador.

9.5. Cromatografía de intercambio aniónico débil (WAX) de los glicanos marcados

Los N-glicanos marcados con 2-AB fueron evaluados por cromatografía de intercambio iónico débil (*weak anion exchange*, WAX) con el fin de determinar la proporción de estructuras neutras, con alto contenido de manosa y mono-, bi-, tri- y tetrasialiladas presentes en la muestra. Para ello se utilizó un cromatógrafo HPLC Waters Alliance acoplado a un detector de fluorescencia ($\lambda_{\text{exc}}= 330 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}}= 420 \text{ nm}$). Las muestras fueron sembradas en una columna ASAHIPAK ES-502N7C (100 x 7,5 mm; 272 SHODEX). Esta cromatografía se basa en la distinta de carga de los glicanos que permite su retención diferencial por los grupos cargados de la matriz de intercambio aniónico. Así, en este tipo de columna, el tiempo elución de los N-glicanos está determinado por el número de cargas presentes en la molécula (debido a la presencia de ácidos siálicos, sulfatos y fosfatos) y, en cierta medida, por el tamaño del glicano.

Para la asignación de las diferentes estructuras de N-glicanos, el perfil obtenido mediante cromatografía de intercambio iónico fue comparado con el perfil de elución de N-glicanos de un estándar de fetuina.

9.6. Digestión de N-glicanos marcados con exoglicosidasas y análisis mediante cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC-HPLC)

Los N-glicanos marcados con 2-AB fueron sometidos a digestión con diferentes arreglos de enzimas exoglicosidasas con el objetivo de evaluar su estructura y composición. Las enzimas empleadas y su concentración se indican a continuación: *Arthrobacter ureafaciens* sialidasa (ABS, EC 3.2.1.18, con especificidad para ácido siálico unido mediante enlaces $\alpha 2\text{-}3$, $\alpha 2\text{-}6$ y $\alpha 2\text{-}8$, Biolabs), 50 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$; β -galactosidasa de testículo bovino (BTG, EC 3.2.1.23, específica para galactosa unida mediante enlaces $\beta 1,3/4$, Sigma), 0,2 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$; β -N-acetilhexosaminidasa de poroto de soja (JBH, EC 3.2.1.52, específica para GlcNAc unida mediante enlace $\beta 1,2/3/4/6$, Prozyme), 6 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$; α -L-fucosidasa de riñón bovino (BKF, EC

3.2.1.51, específica para fucosa unida α 1–2,3,4,6, Sigma), 0,9 U.ml⁻¹. Las digestiones fueron llevadas a cabo en buffer acetato de sodio 50 mM pH 5,5 a 37 °C durante 18 h.

Luego de cada procedimiento de digestión, los N-glicanos fueron analizados mediante HILIC-HPLC empleando una columna TSK gel Amide 80 (4,6 x 250 mm; Tosoh Biosciences) conectada a un sistema de HPLC equipado con un módulo detector de fluorescencia (λ_{exc} = 330 nm; λ_{em} = 420 nm). El gradiente empleado para la separación fue establecido empleando dos fases móviles: ácido fórmico 50 mM ajustado a pH 4,4 con solución de hidróxido de amonio (solvente A) y ACN (solvente B). Para la identificación de estructuras glicosídicas en la muestra se construyó una curva de calibrado empleando un marcador de unidades de glucosa (UG) compuesto de moléculas de dextrano de diferente masa molecular (*dextran ladder*, Sigma) marcado con 2-AB. De este modo, se graficaron las UG en función del área correspondiente a cada pico. Posteriormente, para cada uno de los picos individuales presentes en las muestras se asignó un valor de UG y, sobre la base de lo reportado por la GLYCOBASE (National Institute for Bioprocessing Research and Training, Dublin, Irlanda), se asignaron posibles estructuras glicosídicas a dichos picos.

9.7. Cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC-UPLC) y espectrometría de masas de N-glicanos marcados con 2-AB

Los N-glicanos marcados con 2-AB fueron analizados en una columna Waters Acquity UPLC Glycan BEH Amide (2,1mm x 150mm, diámetro de partícula 1,7 μ m), conectada a un sistema UPLC Bio-Class H con un detector de fluorescencia (λ_{exc} = 330 nm; λ_{em} = 420 nm; Waters) y un espectrómetro de masas cuadrupolo con analizador de tiempo de vuelo Synapt G2-Si (Waters). Estos ensayos fueron realizados como servicio por GEMA-Biotech, Argentina.

Los N-glicanos marcados fueron separados empleando las siguientes fases móviles: ácido fórmico 100 mM pH 4,5 con solución de amonio (solvente A) y ACN (solvente B). Los parámetros de espectrometría de masas fueron establecidos en un modo de ion positivo V. El rango de valores de la relación masa/carga (m/z) fue establecido entre 800 y 1600. La deconvolución de los espectros ESI m/z se llevó a cabo mediante el empleo del *software Mass Biopharmalynx* y permitió calcular la masa molecular de los diferentes iones. La asignación de estructuras a los N-glicanos fue realizada mediante comparación entre el valor de m/z observado y el teórico. Además, se empleó un *ladder* de dextrano marcado con 2-AB para la construcción de la curva de calibrado y la asignación de las UG a los picos presentes en las muestras.

10. Evaluación de la estabilidad térmica del IFN4N derivado de células CHO y HEK

La estabilidad térmica del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} fue evaluada mediante incubación a diferentes temperaturas. El estudio se realizó comparativamente entre las dos variantes.

Se preparó una solución de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de cada variante de IFN4N en PBS-BSA 0,1% (P/V). El ensayo consistió en incubar alícuotas de 50 μl de cada variante durante 10 min a las siguientes temperaturas: 20, 25, 37, 45, 55, 65, 75, 85, 95, conservándose posteriormente a -20 °C. La cuantificación de IFN activo en las muestras sometidas al tratamiento térmico se realizó mediante valoración de la actividad biológica antiviral *in vitro* (sección 8.1). El valor de actividad biológica antiviral obtenido para la muestra sometida a 10 min a 20 °C se tomó como un control de conservación del 100% de actividad, utilizándose para calcular la actividad residual del resto de las muestras. Los resultados obtenidos para cada molécula fueron comparados utilizando el test t de Student, considerando la existencia de diferencias significativas entre muestras cuando $p < 0,05$.

11. Evaluación de la farmacocinética de las variantes del hIFN- α 2b en animales de experimentación utilizando la vía subcutánea

Con el propósito de evaluar la influencia de la porción glicosídica sobre los parámetros farmacocinéticos de las muteínas del hIFN- α 2b, se realizaron experimentos *in vivo* utilizando animales de experimentación. Se llevaron a cabo dos experiencias. Una de ellas consistió en comparar las propiedades farmacocinéticas del IFN4N producido en dos huéspedes diferentes: CHO y HEK. La otra permitió evaluar la influencia del incremento del grado de glicosilación del IFNwt y el IFN4N sobre su comportamiento farmacocinético. De este modo, las muteínas evaluadas fueron: hIFN- α 2b, IFNwtMutNter, IFN4N, IFN4NMutNter, IFN3NM47, IFN2NM47/95, IFN4NM47, IFN3NM47/95 e IFN3N47MutNter. Las variantes mencionadas fueron obtenidas mediante producción en células CHO (sección 5.11) y purificación mediante cromatografía de inmunoafinidad empleando la resina CA5E6-*Sepharose* (sección 6). Los estudios se llevaron a cabo empleando la vía subcutánea.

11.1. Metodología experimental

Se emplearon ratas Wistar hembras, de dos meses de edad, con un peso promedio de 200 g (Comisión Nacional de Energía Atómica, Argentina), las cuales fueron mantenidas en un bioterio a una temperatura controlada de 24 °C y un fotoperíodo luz/oscuridad de 12 h, proporcionándoles agua y comida *ad libitum*. Las ratas fueron separadas en lotes de ocho animales cada uno e inyectadas por vía subcutánea con una dosis única de $2 \cdot 10^5$ UI $\cdot\text{kg}^{-1}$ de peso corporal del animal de cada variante de hIFN- α 2b. 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 a los siguientes tiempos posinyección: 5 y 30 min, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 18, 24, 48, 72, 96 y 120 h. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente y el plasma fue separado y conservado a -20 °C para su posterior análisis.

La cuantificación de cada variante en el plasma se realizó mediante valoración de su actividad biológica antiviral volumétrica (sección 8.1). Con los datos obtenidos se graficó la actividad biológica de cada muestra en función del tiempo transcurrido desde la inoculación de la molécula.

La curva obtenida se analizó aplicando un modelo de un compartimento con absorción y eliminación de primer orden, el cual se ajusta de manera adecuada al comportamiento de drogas administradas en solución acuosa por vía oral, intramuscular o subcutánea (Shargel y col., 2005). 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 (Fig. 15).

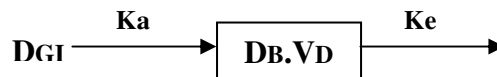


Fig. 15. Modelo de un compartimento con absorción y eliminación de primer orden.

En el caso de una droga administrada en forma oral, la velocidad de desaparición de la droga en el tracto gastrointestinal (GI), que en valor absoluto representa la velocidad de absorción por el organismo, se describe como:

$$\frac{dD_{GI}}{dt} = -FK_a D_{GI} \quad (16)$$

donde D_{GI} es la cantidad de droga en solución en el GI a cualquier tiempo t , k_a es la constante de velocidad de absorción de primer orden y F es la fracción de fármaco absorbida. Integrando la ecuación 16 se obtiene:

$$D_{GI} = FD_0 e^{-K_a t} \quad (17)$$

donde D_0 es la dosis de la droga. La velocidad de eliminación de la droga del organismo se puede expresar como $-k_e D_B$, donde D_B es la cantidad de droga en el cuerpo en el tiempo t y k_e es la constante de eliminación de primer orden. La proporción de cambio de la cantidad de droga en el organismo es la diferencia entre la velocidad de captación (absorción) y la de salida (eliminación), por lo que:

$$\frac{dD_B}{dt} = Fk_a D_{GI} - k_e D_B \quad (18)$$

Reemplazando D_{GI} por la ecuación 17, integrando y reordenando se obtiene la ecuación general que describe la variación de la concentración de una droga en plasma (C_p) a cualquier tiempo t luego de su administración extravascular:

$$C_p = \frac{Fk_a D_0}{V_D (k_a - k_e)} (e^{-k_e t} - e^{-k_a t}) \quad (19)$$

que en forma simplificada se transforma en:

$$C_p = A e^{-k_e t} - A e^{-k_a t} \quad (20)$$

En la Fig. 16 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). Cuando se produce la $C_{m\acute{a}x}$, la velocidad de absorción iguala a la velocidad de eliminación, por lo que el cambio de la concentración de la droga en plasma es igual a cero:

$$\frac{dC_p}{dt} = \frac{Fk_a D_0}{V_D (k_a - k_e)} (k_e e^{-k_e t} - k_a e^{-k_a t}) = 0 \quad (21)$$

lo cual puede ser simplificado a:

$$k_e e^{-k_e t} = k_a e^{-k_a t} \quad (22)$$

Aplicando logaritmos, se obtiene una ecuación para la determinación de $T_{m\acute{a}x}$ (valor que luego se utiliza para el cálculo de $C_{m\acute{a}x}$ mediante la ecuación 20), la cual resulta útil cuando la toma de muestra se realiza en tiempos inapropiados:

$$T_{m\acute{a}x} = \frac{2.3 \log \left(\frac{k_a}{k_e} \right)}{k_a - k_e} \quad (23)$$

Los valores de A , k_a y k_e se determinaron empleando el método de los residuales (Sección 11.2). Estos datos se utilizaron posteriormente para el cálculo del tiempo de vida media terminal ($t_{1/2elim}$), de acuerdo con la siguiente expresión:

$$t_{1/2elim} = \frac{0.693}{k_e} \quad (24)$$

El *clearance* aparente (CL_{app}) es una medida de la velocidad de eliminación de un fármaco del organismo y para la vía de inoculación subcutánea se calcula mediante la siguiente expresión:

$$CL_{app} = \frac{(D_o)_{sc}}{[(AUC)_{sc}]^2} \quad (25)$$

donde $(D_o)_{sc}$ es la dosis inyectada por vía subcutánea y $(AUC)_{sc}$ es el área bajo la curva luego de la administración subcutánea.

Los perfiles plasmáticos obtenidos para cada animal fueron analizados individualmente. Los parámetros farmacocinéticos $T_{máx}$, $C_{máx}$, $t_{1/2elim}$, AUC y CL_{app} se expresaron como el valor promedio \pm SD de los datos obtenidos para cada animal ($n=4$). Los parámetros farmacocinéticos de las diferentes moléculas fueron comparados utilizando el test t de Student o el ANOVA, según correspondiese, considerando la existencia de diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

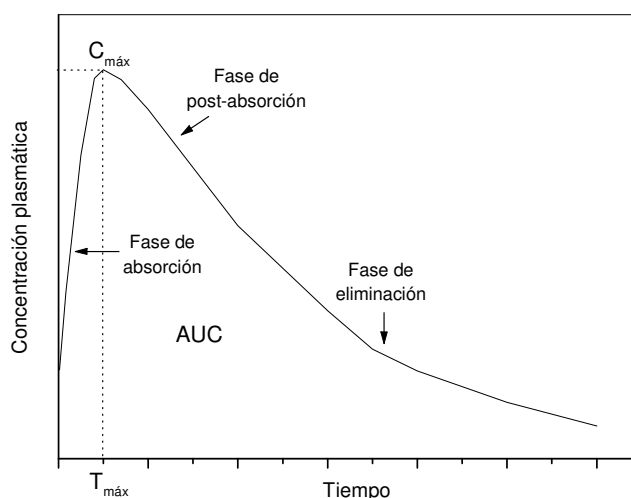


Fig. 16. Perfil plasmático de una droga inyectada mediante una vía extravascular.

Se indican las fases de absorción y de eliminación de la misma (Shargel y col., 2005).

11.2. Estimación de los parámetros farmacocinéticos mediante el método de los residuales

El método de los residuales (Gibaldi y Perrier, 1982) es un procedimiento utilizado habitualmente en farmacocinética para ajustar datos experimentales a una curva. Permite separar una curva en sus componentes, a fin de calcular las constantes que caracterizan dicha función para determinar, finalmente, los parámetros farmacocinéticos de interés.

El perfil plasmático de una droga administrada por una vía extravascular que es absorbida desde el sitio de inyección, distribuida en forma instantánea y posteriormente eliminada mediante una cinética de primer orden se describe de acuerdo con la ecuación 20. Si la constante de absorción k_a es mucho mayor que la constante de eliminación k_e , a tiempos tardíos la absorción de la droga será completa, por lo cual el segundo término de la ecuación 20 se acercará a un valor nulo. En este momento, la concentración plasmática se describirá según la siguiente expresión:

$$C_p^t = A e^{-k_e t} \quad (26)$$

Aplicando logaritmos se obtiene la recta descrita por la ecuación 20, la cual permite el cálculo de la constante de eliminación k_e , a partir de la pendiente, y de la constante A, a partir de la ordenada al origen.

$$\log C_p^t = \frac{-k_e t}{2.3} + \log A \quad (27)$$

La constante de absorción k_a puede ser calculada a partir de la pendiente de la recta que resulta de la representación gráfica del logaritmo de la concentración plasmática residual en función del tiempo, como describe la ecuación 28.

$$\log(C_p^t - C_p) = \frac{-k_a t}{2.3} + \log A \quad (28)$$

12. Estudio de la actividad biológica antitumoral *in vivo* de diferentes muteínas del hIFN- α 2b en animales de experimentación

La actividad antitumoral *in vivo* fue evaluada en ratones *nude* atímicos de la cepa N:NIH nu/nu (Comisión Nacional de Energía Atómica) de 8 a 10 semanas de edad. Esta cepa surgió en Glasgow, Escocia, en el año 1962, por una mutación en una colonia exocriada de ratones albinos Swiss, la cual involucra un gen autosómico y recesivo asociado a la ausencia de pelo que produce una disgenesia gonadal, aumento de la susceptibilidad a infecciones y a variaciones de temperatura. El ratón homocigota recesivo (nu/nu) presenta aplasia de timo, la cual produce numerosos defectos del sistema inmunológico y, por ende, una escasa respuesta a los antígenos timodependientes, debido a deficiencias cuantitativas y funcionales de las células T. Por estas características, es una de la cepa más utilizadas en investigación biomédica en el campo de la oncología, ya que estos animales son capaces de aceptar transplantes tumorales sin producir el rechazo de los mismos (Pantelouris, 1971). Por su condición de inmunodeficientes, los ratones *nude* deben obligatoriamente mantenerse bajo estrictas condiciones ambientales, libres de virus, bacterias, parásitos y hongos, por lo cual se los califica de acuerdo con su condición sanitaria como animales libres de patógenos específicos (SPF) (Carbone y Maschi, 2006).

Los animales se alojaron en un gabinete de flujo laminar tipo I provisto de un filtro HEPA, a una temperatura de (28 ± 1) °C y un fotoperíodo luz/oscuridad de 14-10 h. Se mantuvieron en cajas de acero inoxidable con lecho de viruta estéril y se les proporcionó agua corriente autoclavada y alimento irradiado con luz UV *ad-libitum*. Para su manipulación, se utilizó guardapolvo, guantes, cofia y barbijo, con el fin de evitar la transmisión de agentes infecciosos.

La línea tumoral prostática humana PC-3 fue utilizada para generar el modelo de tumor subcutáneo. Con este fin, las células se cultivaron en medio para células PC-3 y se cosecharon a partir de cultivos subconfluentes mediante desprendimiento enzimático con tripsina. Posteriormente, se lavaron con medio RPMI libre de suero, se contaron y finalmente se resuspendieron en un volumen de PBS de manera de obtener una densidad celular de $1 \cdot 10^7$ cél.ml⁻¹. Los ratones fueron inyectados por vía subcutánea en el flanco trasero izquierdo con 200 µl de suspensión celular ($2 \cdot 10^6$ células por animal). Dos días después de la implantación de las células tumorales, los ratones fueron divididos al azar en diferentes grupos para el comienzo del tratamiento.

En un primer experimento, en el cual se evaluó la actividad biológica antitumoral *in vivo* de IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK}, los ratones fueron separados en tres grupos de seis animales cada uno, dos de los cuales recibieron una inyección semanal subcutánea peritumoral de 5 µg de cada una de las proteínas. El grupo restante recibió inyecciones de PBS estéril, que constituye el vehículo con el cual se realizaron las diluciones de las moléculas a evaluar.

En una segunda experiencia, se conformaron cinco grupos de seis animales cada uno, cuatro de los cuales recibieron una dosis semanal de 5 µg de las diferentes variantes de hIFN-α2b. Al igual que en la experiencia anterior, el grupo restante recibió inyecciones de la solución vehículo.

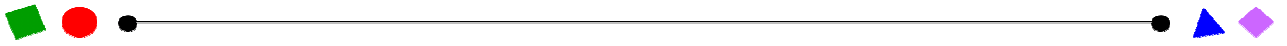
La medición de las dimensiones de los tumores se llevó a cabo semanalmente previo al tratamiento utilizando un calibre. El cálculo del volumen tumoral se realizó asumiendo una geometría elíptica, debido a que se ha encontrado que la fórmula del elipsoide permite correlacionar adecuadamente el volumen con la masa del tumor (Tomayko y Reynolds, 1989). De acuerdo con ello, se utilizó la siguiente ecuación:

$$V(\text{cm}^3) = \frac{1}{2} \times L \times W^2 \quad (29)$$

donde L es el eje mayor y W el eje menor del tumor. Para cada grupo, se graficó el volumen del tumor en función del tiempo transcurrido desde el comienzo del tratamiento. La velocidad de crecimiento del tumor bajo las diferentes terapias se determinó como la pendiente de la curva obtenida para cada animal y se expresó como el valor promedio \pm SD.

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

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de esta tesis se presentan en dos capítulos.

El primer capítulo detalla los resultados de los experimentos realizados para el cumplimiento del primer objetivo específico planteado para esta tesis, es decir, la optimización de la etapa de *upstream* del proceso de producción del IFN4N. Se abordan experimentos como la generación de líneas celulares recombinantes productoras del IFN4N mediante el empleo de partículas lentivirales para la transferencia de genes a dos huéspedes celulares diferentes: CHO y HEK; su posterior clonado y la comparación de los clones con otros obtenidos previamente en el laboratorio mediante la implementación de una tecnología diferente de transferencia de genes. En este mismo capítulo se definen las condiciones del proceso de *downstream* y se muestran los resultados obtenidos. Asimismo, se describen las metodologías empleadas para la caracterización fisicoquímica y biológica *in vitro* e *in vivo* de las proteínas puras. Esta primera etapa permitió definir la purificación y el modo de caracterización de las variantes hiperglicosiladas de hIFN- α 2b, que también se aplican en el siguiente capítulo.

En el segundo capítulo se detalla el diseño y obtención de nuevas muteínas hiperglicosiladas de hIFN- α 2b con el principal objetivo de obtener análogos que presenten características mejoradas respecto de la variante IFN4N. De este modo, se muestran los resultados asociados a la construcción de las muteínas, generación de las líneas celulares, obtención de clones productores y producción de las nuevas variantes en condiciones de adherencia. Las etapas de purificación y caracterización fueron desarrolladas en función de los resultados obtenidos en el primer capítulo. Dada la extensión del presente trabajo de tesis, los resultados correspondientes a la evaluación del sistema huésped para la producción de IFN4N no fueron aplicados a la producción de las nuevas variantes hiperglicosiladas de hIFN- α 2b. En este capítulo, se profundizó sobre la importancia de las modificaciones realizadas a nivel molecular para lograr el objetivo propuesto de mejorar la actividad biológica *in vivo*.

1. Optimización de la etapa de *upstream* del proceso de producción del IFN4N

Para la optimización de la etapa de expresión se propuso evaluar dos estrategias diferentes para la generación de las líneas celulares productoras, así como también dos huéspedes diferentes: células CHO y células HEK.

1.1. Obtención de los vectores de expresión conteniendo el gen del IFN4N

En nuestro laboratorio se obtuvo el vector pCI-neo-IFN4N conteniendo la variante IFN4N (Ceaglio y col. 2008), el cual consiste en un vector plasmídico convencional adecuado para la transfección de células eucariotas y para la expresión de la mencionada variante hiperglicosilada derivada del hIFN- α 2b. Con el objetivo de clonar la secuencia del IFN4N en otro vector de expresión, el cual constituye el vector de transferencia de un sistema lentiviral de tercera generación, el plásmido pCI-neo fue digerido con las enzimas de restricción *Nhe* I y *Sal* I y posteriormente evaluado mediante electroforesis en gel de agarosa. Como producto de la digestión se observó la liberación de un inserto de aproximadamente 680 pb correspondiente a la secuencia de IFN4N. Este fragmento fue purificado a partir del gel y posteriormente ligado al vector pLV-PLK (vector de transferencia del sistema lentiviral), linealizado con las mismas enzimas de restricción. El esquema de este clonado se muestra en la Fig. 17.

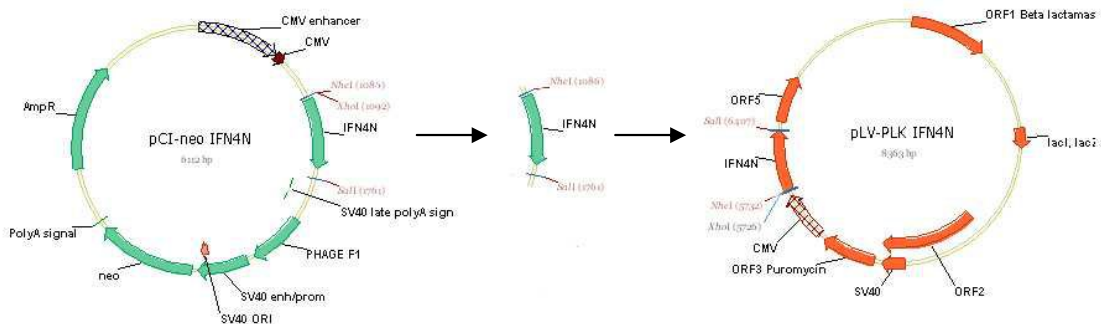


Fig. 17. Esquema de clonado del vector pLV-PLK-IFN4N a partir del plásmido pCI-neo-IFN4N

El vector pCI-neo-IFN4N fue digerido con las enzimas de restricción *Nhe* I/*Sal* I. El producto liberado, correspondiente a la secuencia de IFN4N, fue ligado al vector pLV-PLK digerido con las mismas enzimas.

El producto de la reacción de ligación se empleó para la transformación de bacterias *E. coli* TOP10 competentes. Las bacterias transformadas fueron sembradas en placas conteniendo medio LB-agar suplementado con ampicilina, de manera que sólo crezcan las bacterias que incorporaron el plásmido. A partir de cada placa se repicaron 8 clones que fueron analizados mediante la técnica de PCR en colonia, empleando los oligonucleótidos IFN alfa forward (IFNalfaF) e IFN alfa reverse (IFNalfaR), que permiten

amplificar un fragmento de 719 pb que contiene la secuencia completa del IFN4N. En todos los clones evaluados se observó la presencia del inserto IFN4N (Fig. 18).

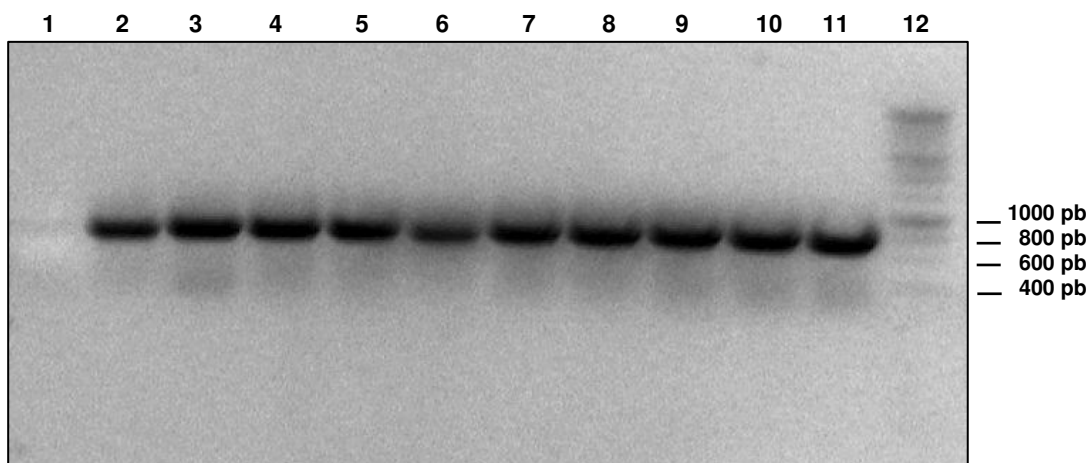


Fig. 18. Electroforesis en gel de agarosa de las muestras provenientes del ensayo de PCR en colonia para el vector pLV-PLK-IFN4N

La presencia de producto amplificado indicó la correcta ligación del inserto IFN4N al vector pLV-PLK.

Calles: 1: Control negativo
2-11: Clones pLV-PLK-IFN4N
12: Marcadores de masa molecular (200bp DNA Step Ladder)

Dos de los clones analizados mediante PCR en colonia fueron sometidos a digestión con las enzimas de restricción *Xho* I y *Sal* I. La muestra resultante fue analizada mediante electroforesis en gel de agarosa (Fig. 19), observándose la ausencia de un fragmento liberado para el control negativo y la presencia de una banda de aproximadamente 700 pb para los clones positivos.

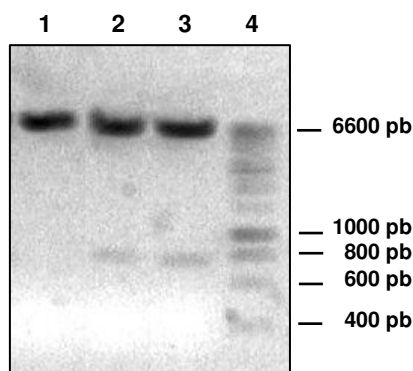


Fig. 19. Electroforesis en gel de agarosa de dos clones plasmídicos derivados de la ligación pLV-PLK-IFN4N digeridos con las enzimas de restricción *Xho* I/*Sal* I

La liberación de un fragmento de aproximadamente 700 pb confirmó la presencia de la secuencia del IFN4N en vector pLV-PLK.

Calles: 1: Control negativo
2-3: Clones pLV-PLK-IFN4N
4: Marcadores de masa molecular (200bp DNA Step Ladder)

1.2. Generación de líneas celulares productoras de IFN4N

En la actualidad existen diversas metodologías que permiten llevar a cabo la introducción del material genético de interés en el genoma celular. Sin embargo, la mayoría de ellas se caracterizan por la integración del transgén al azar en sitios impredecibles del genoma, lo cual generalmente resulta en su baja o nula expresión. Solo unas pocas metodologías permiten obtener de manera eficiente líneas celulares con elevadas producciones específicas de la proteína en estudio. La efectividad de estas metodologías se debe a su naturaleza intrínseca que conduce a la integración del *cassette* de expresión en regiones del genoma transcripcionalmente activas (Bussöw, 2015).

Inicialmente en nuestro laboratorio se llevó a cabo la generación de líneas celulares seguida de un proceso de presión selectiva con el agente específico determinado por el gen de resistencia presente en el vector de expresión empleado. Esta metodología permitió obtener el clon 4N2F5 derivado de la línea celular CHO pCIneo IFN4N (Ceaglio y col., 2008) con el cual se llevó a cabo la producción de esta molécula en trabajos previos. Sin embargo, su producción específica, al igual que la de otros clones obtenidos mediante el empleo de esta tecnología, fue muy baja. La necesidad de generar procesos más rentables desde el punto de vista de la producción de la molécula para facilitar posteriores procedimientos de purificación y caracterización condujo al empleo de la tecnología de vectores lentivirales.

Las células CHO fueron elegidas como huéspedes con el objetivo de generar nuevos clones para reemplazar al clon 4N2F5. Esta línea celular constituye uno de los sistemas de producción más empleados en la industria farmacéutica para la generación de proteínas recombinantes de uso terapéutico a gran escala. Por otro lado, la línea celular HEK es muy fácil de transfectar y transducir y, en consecuencia, permite generar líneas celulares con elevados niveles de producción de la proteína estudiada. Todo lo expuesto resulta interesante para mejorar el sistema de producción del IFN4N.

Con el fin anteriormente expuesto, se generaron mediante transducción (Td) las líneas celulares CHO Td IFN4N y HEK Td IFN4N. Para ello se empleó la misma metodología y el mismo lote de LVs, de manera de comparar las producciones específicas de las líneas celulares resultantes.

Una vez transducidas, las células fueron sometidas a un proceso de presión selectiva empleando concentraciones crecientes de puromicina (agente de selección cuyo gen de resistencia se encuentra en el vector de transferencia). Las células HEK demostraron ser más sensibles a la acción de la puromicina, motivo por el cual el proceso de selección se inició con $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ del agente mencionado mientras que para las células CHO se inició con $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Para esta última línea celular, el incremento de concentraciones de puromicina se realizó de manera más drástica al inicio ($10, 100, 200, 300 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y luego más suave (350 y $400 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), ya que estas células demostraron una buena respuesta con un elevado

porcentaje de supervivencia de la población frente a cada etapa de selección. En el caso de las células HEK el incremento de concentraciones de puromicina se realizó de manera más gradual (5, 10, 20, 50, 100, 150, 200 y 250 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), ya que se observó un menor porcentaje de supervivencia frente a cada etapa de selección. La máxima concentración de puromicina empleada para cada caso resultó la condición de letalidad de la correspondiente línea celular. Las líneas celulares seleccionadas por su resistencia a las diferentes concentraciones de puromicina fueron posteriormente evaluadas en función de la producción específica de IFN4N.

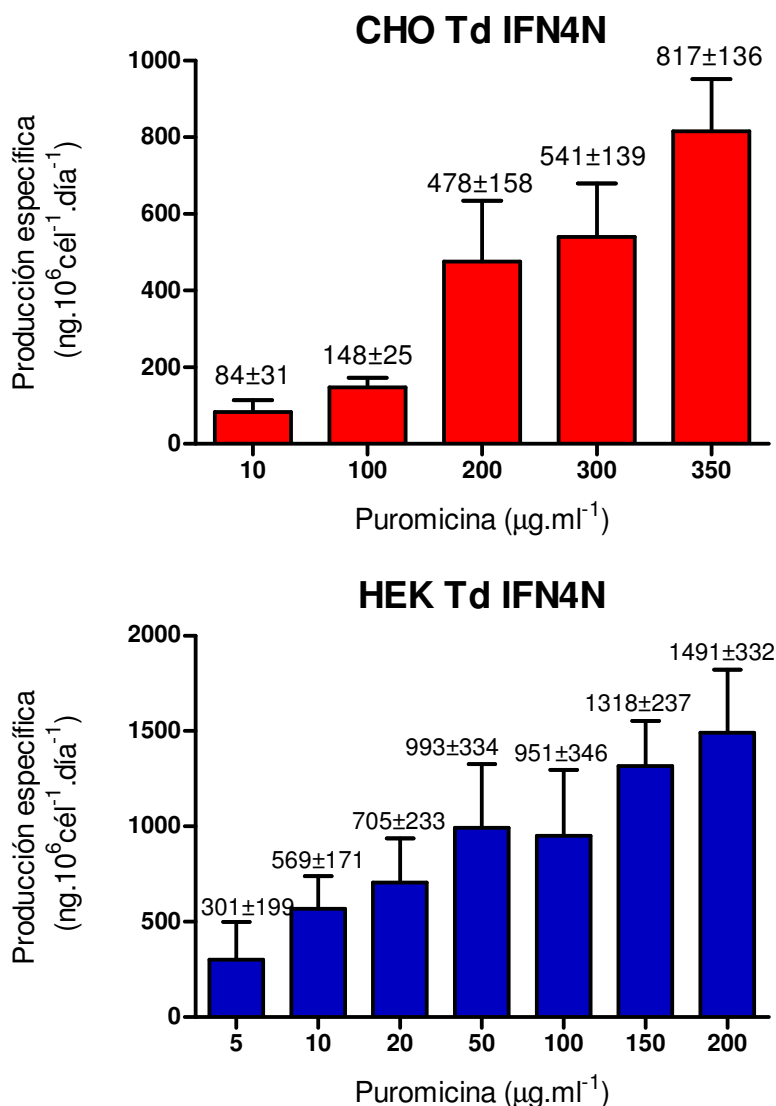


Fig. 20. Producción específica de IFN4N por parte de las líneas celulares CHO Td IFN4N (■) y HEK Td IFN4N (■) durante el procedimiento de selección con puromicina. La producción específica de IFN4N se graficó en eje de ordenadas en función de la concentración de puromicina (eje de abscisas). La producción específica de cada línea celular se indica en la parte superior de cada barra.

En la Fig. 20 se observa una correlación directa entre el incremento de la concentración del agente de selección y la producción celular específica de IFN4N tanto para la línea celular HEK Td IFN4N como para CHO Td IFN4N. Asimismo, la máxima productividad de IFN4N por parte de la línea celular CHO Td IFN4N (350) fue de $817 \pm 136 \text{ ng} \cdot 10^6 \text{ cél}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ mientras que para la línea celular HEK Td IFN4N (200) fue de $1491 \pm 332 \text{ ng} \cdot 10^6 \text{ cél}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ (entre paréntesis se indica la mayor concentración de puromicina a la cual resistió la línea celular generada). A pesar de que la resistencia a puromicina por parte de la línea celular CHO Td IFN4N fue superior con respecto a la línea celular HEK Td IFN4N, esta última evidenció una productividad de IFN4N dos veces superior respecto de su contraparte CHO.

Las líneas celulares CHO Td IFN4N (350) y HEK Td IFN4N (200) fueron elegidas para proceder a la etapa siguiente de aislamiento de clones celulares productores de IFN4N.

1.3. Clonado de las líneas celulares productoras de IFN4N

Si bien las líneas celulares constituyen una fuente permanente e ilimitada de la proteína recombinante en estudio, el clonado de las mismas es necesario a los fines de obtener clones celulares capaces de producir la proteína de interés con características específicas que permanezcan homogéneas y reproducibles a lo largo del tiempo.

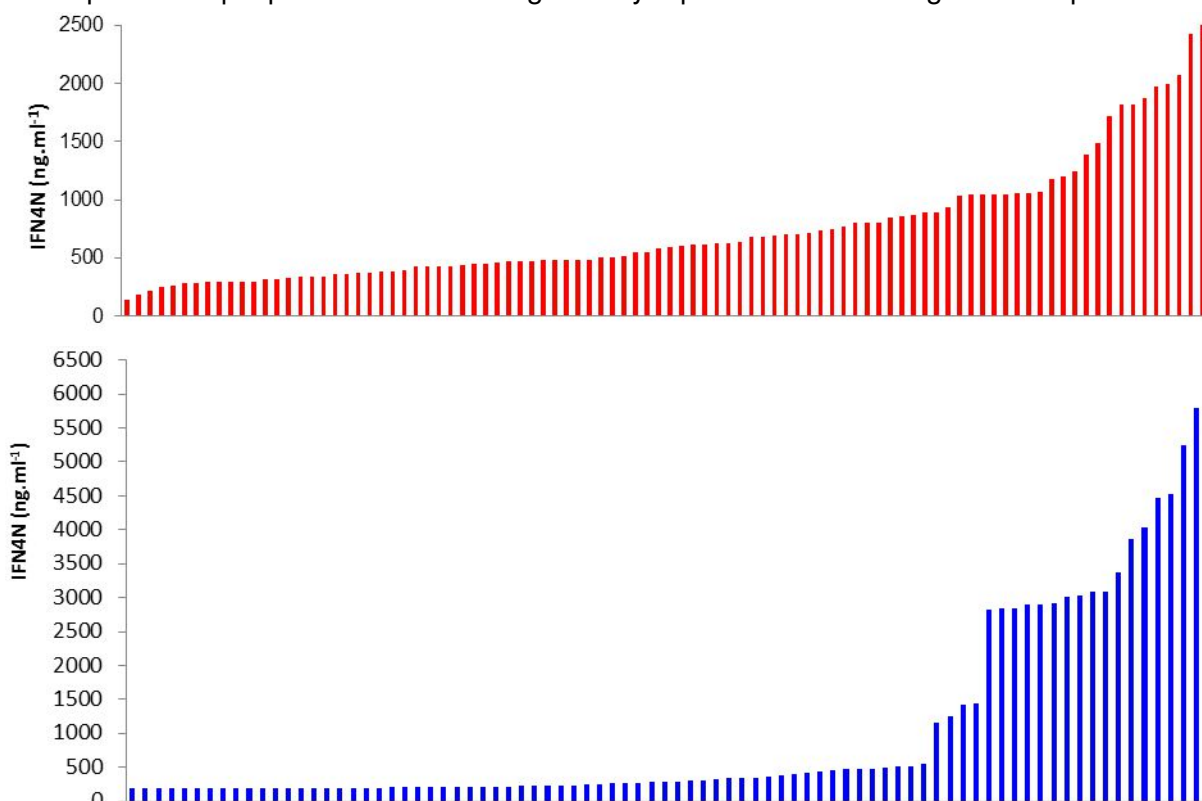


Fig. 21. Primer *screening* del clonado de las líneas celulares CHO Td IFN4N (350) (■) y HEK Td IFN4N (200) (■)

Para cada clon se graficó la concentración de IFN4N (evaluado mediante ELISA sándwich) presente en los sobrenadantes obtenidos luego del cultivo de cada uno de ellos en las placas de clonado.

El clonado de las líneas celulares CHO Td IFN4N (350) y HEK Td IFN4N (200) se realizó mediante el método de dilución límite. Luego de 15-20 días transcurridos desde el inicio del clonado, se llevó a cabo su primer *screening* mediante cuantificación del IFN4N presente en los sobrenadantes de cultivo empleando el ensayo ELISA sándwich (Fig. 21). Durante el primer *screening* se evaluaron 94 clones provenientes de la línea celular CHO Td IFN4N (350) y 84 clones provenientes de la línea celular HEK Td IFN4N (200). Teniendo en cuenta la concentración determinada por ELISA sándwich en relación al tamaño de cada colonia evidenciado por microscopía, se seleccionaron 24 clones CHO y 22 clones HEK para llevar a cabo, posteriormente, un ensayo de evaluación de producción específica de IFN4N. El resultado de este segundo *screening* evidenció la mayor productividad para los clones P4D3, P1E9, P2A9, P1B6, P1B7 y P1B8 correspondientes a la línea celular derivada de células CHO y P2A5, P2C7, P2G11, P3B7, P3H8 y P4B4 para la línea celular HEK (Fig. 22).

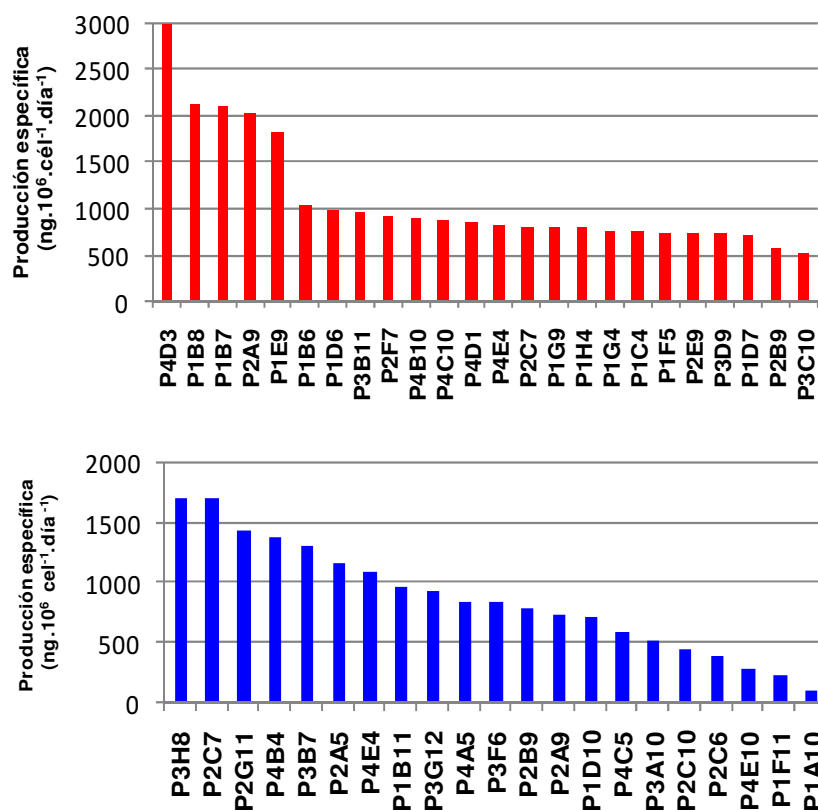


Fig. 22. Segundo *screening* del clonado de las líneas celulares CHO Td IFN4N (350) (■) y HEK Td IFN4N (200) (■)

Se evaluó la producción específica de IFN4N por parte de cada clon seleccionado, siguiendo el procedimiento indicado en M&M.

1.4. Caracterización de los clones de células CHO y HEK productores de IFN4N. Elección del clon apropiado para el proceso de producción

El análisis de los clones productores de la proteína recombinante de interés es imperioso a los fines de conocer las características de crecimiento de cada uno de ellos, teniendo en cuenta las velocidades de consumo de sustratos y generación de productos, considerando como productos no sólo a la proteína en estudio sino también a otros metabolitos indeseados. A su vez, es importante estudiar las características de la proteína producida por cada uno de los clones, prestando especial atención a su actividad biológica específica *in vitro*, grado de glicosilación, masa molecular aparente, entre otras. Todo esto nos permitirá elegir el clon productor apropiado y las condiciones de cultivo más convenientes para obtener la proteína de interés con las características deseadas.

1.4.1. Análisis de las características de crecimiento, consumo de nutrientes, producción de metabolitos y de la proteína de interés por parte de los clones seleccionados

En la Fig. 23a se observan las curvas de crecimiento para todos los clones derivados de la línea celular CHO Td IFN4N (350) y HEK Td IFN4N (200). Las mismas se obtuvieron graficando la concentración de células viables (cél. ml^{-1}) en función del tiempo (h). En la Fig. 23b se observan las curvas de viabilidad para cada uno de los clones, las cuales resultan de graficar el porcentaje de viabilidad en función del tiempo (h). En la tabla III se describen los parámetros μ (velocidad específica de crecimiento), q_{IFN} , q_{lac} , q_{amon} y q_{gluc} (velocidades específicas de producción de IFN4N, lactato y amonio y consumo de glucosa) para cada uno de los clones, así como también un promedio de ellos.

En general, se observó mayor disparidad en el crecimiento de cada uno de los clones derivados de la línea celular CHO Td IFN4N (350) (Fig. 23a curvas rojizas) mientras que los clones provenientes de la línea celular HEK Td IFN4N (200) presentaron curvas de crecimiento muy similares (Fig. 23a curvas azuladas).

Específicamente, el clon CHO Td IFN4N (350) P4D3 evidenció un tiempo de duplicación celular superior a las 24 h, alcanzando la etapa de confluencia a una menor concentración celular ($7 \cdot 10^5 \text{ cél. ml}^{-1}$) respecto de los demás clones. Esto podría explicarse sobre la base de sus características macroscópicas, particularmente su morfología, ya que este clon se caracterizó por presentar células de mayor tamaño. Los clones CHO Td IFN4N (350) P1E9, P2A9, P1B6, P1B7 y P1B8 presentaron un tiempo de duplicación celular de aproximadamente 24 h, alcanzando la confluencia a concentraciones celulares superiores a $1 \cdot 10^6 \text{ cél. ml}^{-1}$. El clon P1B8 alcanzó la mayor concentración celular.

Por otra parte, para todos los clones obtenidos a partir de la línea celular HEK Td IFN4N (200) se pudo observar un tiempo de duplicación celular de aproximadamente 24 h.

Además, la máxima densidad celular alcanzada fue aproximadamente $8-9 \cdot 10^5$ cél.ml⁻¹. El clon P2A5 alcanzó la mayor concentración celular.

Tanto los clones CHO como los clones HEK mantuvieron un elevado porcentaje de viabilidad durante las 168 h del ensayo. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la determinación de células no viables en cultivos adherentes resulta difícil ya que generalmente se encuentran en el sobrenadante de cultivo que es retirado antes de despegar mediante el uso de tripsina las células adheridas al soporte para realizar el recuento de las mismas.

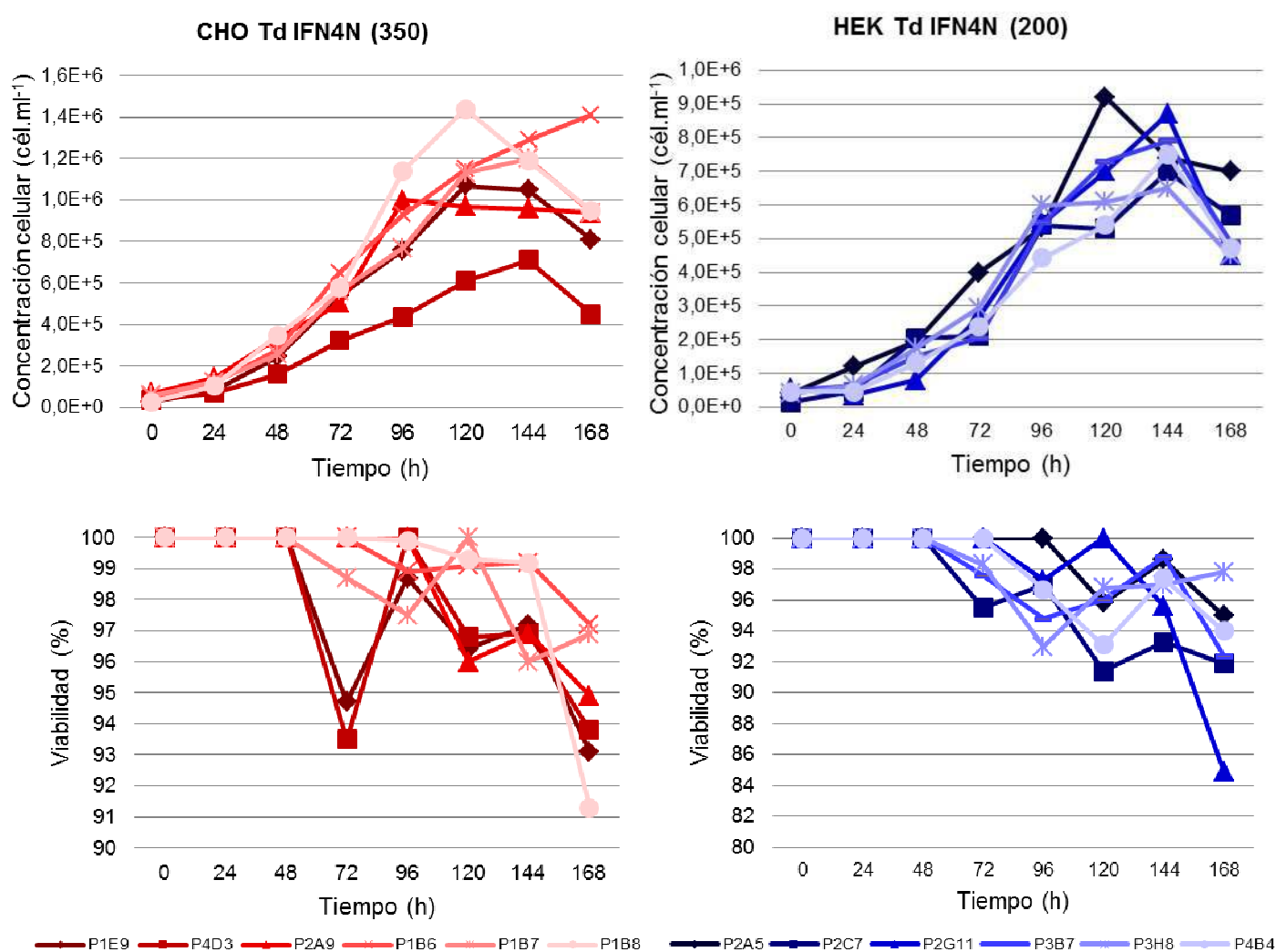


Fig. 23. Curvas de crecimiento (a) y viabilidad (b) para los clones productores de IFN4N derivados de células CHO (■) y HEK (■)

Tabla III. Parámetros de crecimiento, consumo de glucosa y producción de lactato, amonio e IFN4N por parte de los clones derivados de células CHO y HEK

CHO Td IFN4N (350)										
Clones	μ (h^{-1})	q_{IFN} ($ng \cdot 10^6 \text{cél}^{-1} \cdot h^{-1}$)		q_{gluc} ($\mu g \cdot 10^6 \text{cél}^{-1} \cdot h^{-1}$)		q_{lac} ($\mu g \cdot 10^6 \text{cél}^{-1} \cdot h^{-1}$)		q_{amon} ($nmol \cdot 10^6 \text{cél}^{-1} \cdot h^{-1}$)		
P4D3	0,018 \pm 0,002	79	\pm 8	36	\pm 5	40	\pm 5	0,027	\pm 0,007	
P1E9	0,020 \pm 0,002	35	\pm 4	24	\pm 4	45	\pm 5	0,027	\pm 0,003	
P2A9	0,025 \pm 0,001	41	\pm 4	30	\pm 2	31	\pm 1	0,014	\pm 0,004	
P1B6	0,024 \pm 0,002	19	\pm 3	26	\pm 5	49	\pm 5	0,013	\pm 0,005	
P1B7	0,019 \pm 0,002	41	\pm 3	31	\pm 4	35	\pm 2	0,017	\pm 0,006	
P1B8	0,028 \pm 0,002	42	\pm 3	21	\pm 3	34	\pm 2	0,015	\pm 0,004	
Promedio	0,022 \pm 0,004	43	\pm 20	28	\pm 5	39	\pm 7	0,019	\pm 0,006	

HEK Td IFN4N (200)										
Clones	μ (h^{-1})	q_{IFN} ($ng \cdot 10^6 \text{cél}^{-1} \cdot h^{-1}$)		q_{gluc} ($\mu g \cdot 10^6 \text{cél}^{-1} \cdot h^{-1}$)		q_{lac} ($\mu g \cdot 10^6 \text{cél}^{-1} \cdot h^{-1}$)		q_{amon} ($nmol \cdot 10^6 \text{cél}^{-1} \cdot h^{-1}$)		
P2A5	0,020 \pm 0,001	129	\pm 10	56	\pm 6	37	\pm 4	0,014	\pm 0,003	
P2C7	0,015 \pm 0,002	122	\pm 13	62	\pm 11	38	\pm 3	0,009	\pm 0,003	
P2G11	0,017 \pm 0,002	82	\pm 6	47	\pm 9	31	\pm 3	0,008	\pm 0,002	
P3B7	0,016 \pm 0,002	99	\pm 8	55	\pm 8	31	\pm 3	0,008	\pm 0,003	
P3H8	0,027 \pm 0,001	82	\pm 11	46	\pm 6	34	\pm 3	0,008	\pm 0,001	
P4B4	0,017 \pm 0,002	63	\pm 5	61	\pm 15	32	\pm 3	0,009	\pm 0,001	
Promedio	0,019 \pm 0,004	96	\pm 26	55	\pm 7	34	\pm 3	0,009	\pm 0,002	

En general, los valores de q_{lac} fueron levemente inferiores para las células HEK (q_{lac} promedio $34 \text{ ng} \cdot 10^6 \text{cél}^{-1} \cdot h^{-1}$ vs. $39 \text{ ng} \cdot 10^6 \text{cél}^{-1} \cdot h^{-1}$ para las células CHO), a pesar de que estos clones evidenciaron un consumo de glucosa superior respecto de los clones CHO. Asimismo los clones derivados de HEK demostraron, en promedio, una producción específica de amonio aproximadamente del 50% con respecto al promedio demostrado por los clones derivados de células CHO. La velocidad específica de crecimiento promedio fue similar para los clones provenientes de ambos linajes celulares. Sin embargo, la q_{IFN} fue claramente superior para los clones celulares HEK, siendo HEK Td IFN4N (200) P2A5 el clon que demostró la mayor velocidad específica de producción de la proteína en estudio. Además, el clon mencionado evidenció la mayor producción acumulada de IFN4N luego de 7 días de cultivo (Fig. 24, barras azules). Para los clones provenientes de CHO Td IFN4N (350) podemos observar que el clon P1B8 evidenció la mayor μ y una q_{IFN} superior a los demás clones, excepto si lo comparamos con el clon P4D3, cuya q_{IFN} duplicó al valor correspondiente para P1B8. Sin embargo, el clon P4D3 manifestó la menor velocidad

específica de crecimiento, por lo que no resultaría adecuado para un posible proceso de adaptación de su crecimiento en suspensión con el objetivo de producción de IFN4N. Además, el clon P1B8 presentó una producción acumulada de IFN4N superior a todos los clones analizados (Fig. 24, barras rojas) por lo que se postuló como un posible candidato para la producción de la proteína estudiada y posterior evaluación de su calidad.

Al comparar los resultados de producción acumulada de IFN4N al cabo de 7 días de cultivo de todos los clones, se observó que la misma fue superior para los clones derivados de células HEK. La Fig. 24 muestra que, transcurridas 168 h de iniciado el cultivo, los clones derivados de HEK Td IFN4N (200) demostraron un rango de producción acumulada de IFN de 3,1 a 10,9 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, mientras que los clones provenientes de CHO Td IFN4N (350) demostraron una producción acumulada en el rango de 2,1 a 4,9 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Este resultado es consistente tanto con los valores de velocidad específica de producción de IFN4N calculados para cada uno de los clones como así también con los valores de productividad específica calculados para cada una de las líneas celulares que les dieron origen.

Es para destacar que los valores de producción específica de IFN4N obtenidos a partir del cultivo de los nuevos clones de células CHO y HEK superaron ampliamente el correspondiente valor de productividad calculado para el clon 4N2F5, el cual había sido obtenido previamente en nuestro laboratorio mediante transfección. Este último clon mostró una q_{IFN} de aproximadamente $2 \text{ ng}\cdot 10^6 \text{ cél}^{-1}\cdot \text{h}^{-1}$, lo que representa entre un 2% y un 5% de las producciones específicas promedio de los clones obtenidos mediante procedimiento de transducción de células HEK y CHO, respectivamente. Este resultado nos permitió definir a la tecnología de vectores lentivirales de tercera generación como la herramienta más apropiada para la generación de líneas celulares que presenten elevadas producciones específicas de la proteína de interés.

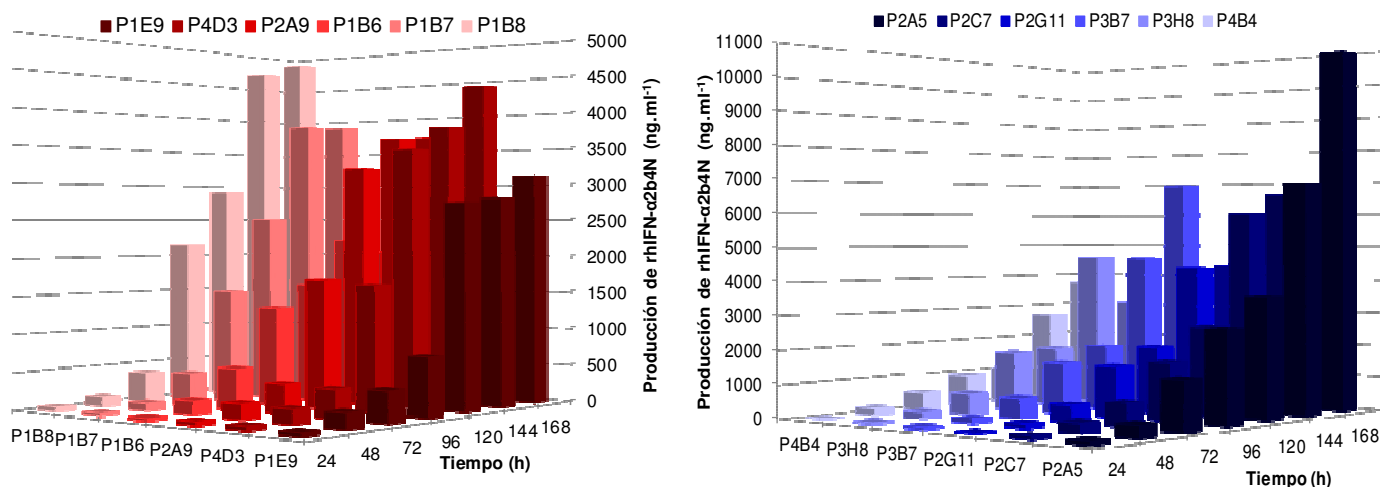


Fig. 24. Producción acumulada de IFN4N luego de 168 h de cultivo de los clones derivados de CHO Td IFN4N (350) y de HEK Td IFN4N (200).

Se representa la concentración acumulada de IFN4N (ng.ml^{-1}) en función del tiempo de cultivo transcurrido para cada uno de los clones analizados.

1.4.2. Caracterización del IFN4N producido por cada uno de los clones obtenidos a partir de CHO Td IFN4N (350) y HEK Td IFN4N (200)

Para la elección del clon productor de IFN4N se estudiaron dos propiedades que se consideran de importancia para predecir el comportamiento *in vivo* de la molécula: grado de glicosilación y actividad biológica *in vitro*. Por este motivo, se llevó a cabo la caracterización del IFN4N producido por cada uno de los clones celulares derivados de células CHO (IFN4N_{CHO}) y HEK (IFN4N_{HEK}) a partir de sobrenadantes de cultivo. La elección del clon productor del IFN4N_{HEK} se llevó a cabo mediante comparación entre los clones obtenidos, mientras que el clon de células CHO fue elegido mediante comparación con las características de la molécula producida por el clon 4N2F5, de manera de seleccionar el que más se asemeje y lograr, así, su reemplazo por otro con superior capacidad de producción.

1.4.2.1. Análisis del grado de glicosilación del IFN4N producido por los clones derivados de células CHO y HEK

Se realizaron ensayos de SDS-PAGE e isoelectroenfoco seguidos de *wb* con el objetivo de tener información preliminar con relación al grado de glicosilación evaluado mediante el análisis de la masa molecular aparente y de la proporción de isoformas del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} producido por cada uno de los clones seleccionados. Asimismo, se llevó a cabo su comparación con el IFN4N producido por el clon celular 4N2F5.

En la Fig. 25 se observa el perfil electroforético del IFN4N_{CHO} proveniente de los diferentes clones analizados mediante SDS-PAGE/*wb*. En general, los nuevos clones produjeron IFN4N con patrones de bandas muy similares entre sí. Su comparación con la molécula producida por el clon de referencia (4N2F5) permitió concluir en la coincidencia de sus masas moleculares máximas. Sin embargo, no fue posible comparar las bandas de menor masa molecular dada la baja capacidad productiva del clon 4N2F5, motivo por el cual esta primera parte de la tesis se orientó a reemplazar el mismo.

En la Fig. 26 se observan los perfiles electroforéticos de los sobrenadantes de cultivo de los clones productores de IFN4N_{HEK}. Todos ellos evidenciaron un perfil electroforético muy similar. Sin embargo, sus masas moleculares máximas (~45 kDa) se mostraron ligeramente inferiores a la del IFN4N producido por los distintos clones de CHO (~55 kDa).

Por otra parte, al igual que para las variantes producidas en células CHO, se observó la presencia de una banda de importante proporción con una masa molecular entre 18-19 kDa, posiblemente coincidente con el hIFN- α 2b nativo (IFNwt), que porta un sitio de O-glicosilación en el residuo de Thr106, o de su variante no glicosilada.

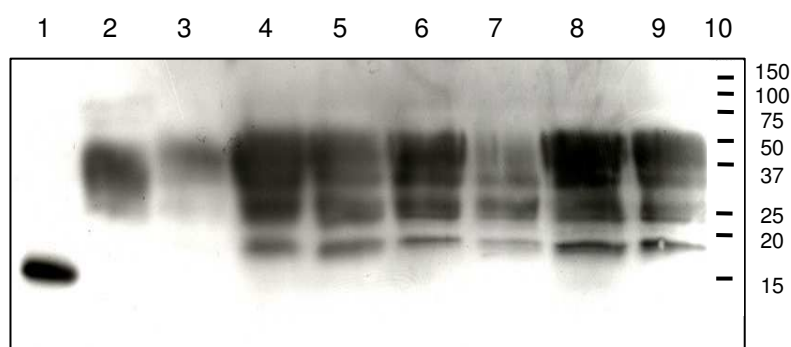


Fig. 25. Grado de glicosilación del IFN4N producido por los clones derivados de CHO Td IFN4N (350). Evaluación mediante SDS-PAGE/*wb*

Los sobrenadantes de cultivo (SN) cosechados a partir de los diferentes clones fueron evaluados y comparados en relación al grado de glicosilación con el rhIFN- α 2b no glicosilado y el IFN4N producido por el clon 4N2F5.

- Calles:
- 1- rhIFN- α 2b no glicosilado
 - 2- IFN4N purificado 4N2F5
 - 3- SN clon 4N2F5
 - 4- SN clon P4D3
 - 5- SN clon P1E9
 - 6- SN clon P2A9
 - 7- SN clon P1B6
 - 8- SN clon P1B7
 - 9- SN clon P1B8
 - 10- Marcadores de masa molecular (kDa)

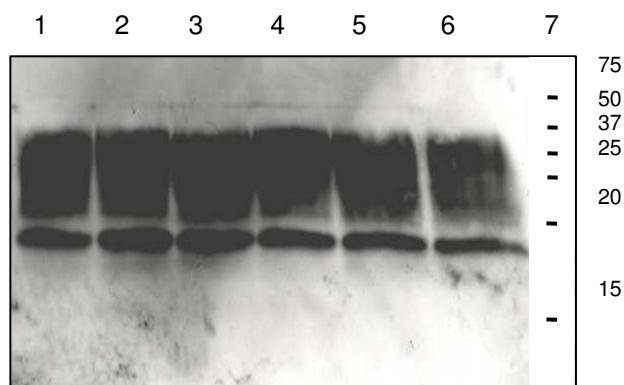


Fig. 26. Grado de glicosilación del IFN4N producido por los clones derivados de HEK Td IFN4N (200). Evaluación mediante SDS-PAGE/*wb*

Los SN cosechados a partir de los diferentes clones de HEK fueron evaluados y comparados entre sí con relación al grado de glicosilación

Calles: 1- SN clon P2A5
 2- SN clon P2C7
 3- SN clon P2G11
 4- SN clon P3B7
 5- SN clon P3H8
 6- SN clon P4B4

Por otra parte, se realizaron ensayos de IEF/*wb* con el objetivo de evaluar y comparar las isoformas correspondientes a IFN4N producido por los clones de células CHO y HEK (Fig. 27). Todas las muestras presentaron un gran número de isoformas repartidas en el gradiente de pH, como consecuencia de la macro/microheterogeneidad que presenta el IFN4N debido a su elevado grado de glicosilación (Ceaglio y col., 2010a). En general, se observó una distribución similar de isoformas entre clones provenientes de la misma línea celular.

En particular, el IFN4N producido por los nuevos clones de células CHO demostró una mayor concentración de isoformas hacia la zona más ácida del gel. Este comportamiento coincidió con el evidenciado por el IFN producido por el clon de referencia 4N2F5.

Por otra parte, las muestras correspondientes a IFN4N_{HEK} presentaron isoformas uniformemente distribuidas a lo largo del gradiente de pH. A su vez, para todas ellas se observó una banda que se ubicó por fuera del gradiente y migró, a partir del punto de siembra, en sentido opuesto al resto de las isoformas. La banda mencionada podría corresponder a la variantes de IFN4N con un menor grado de glicosilación y, en consecuencia, con un bajo contenido de ácido siálico o, bien, no glicosiladas.

Las muestras derivadas de clones celulares CHO alcanzaron zonas más ácidas del gel en comparación con las muestras provenientes de células HEK.

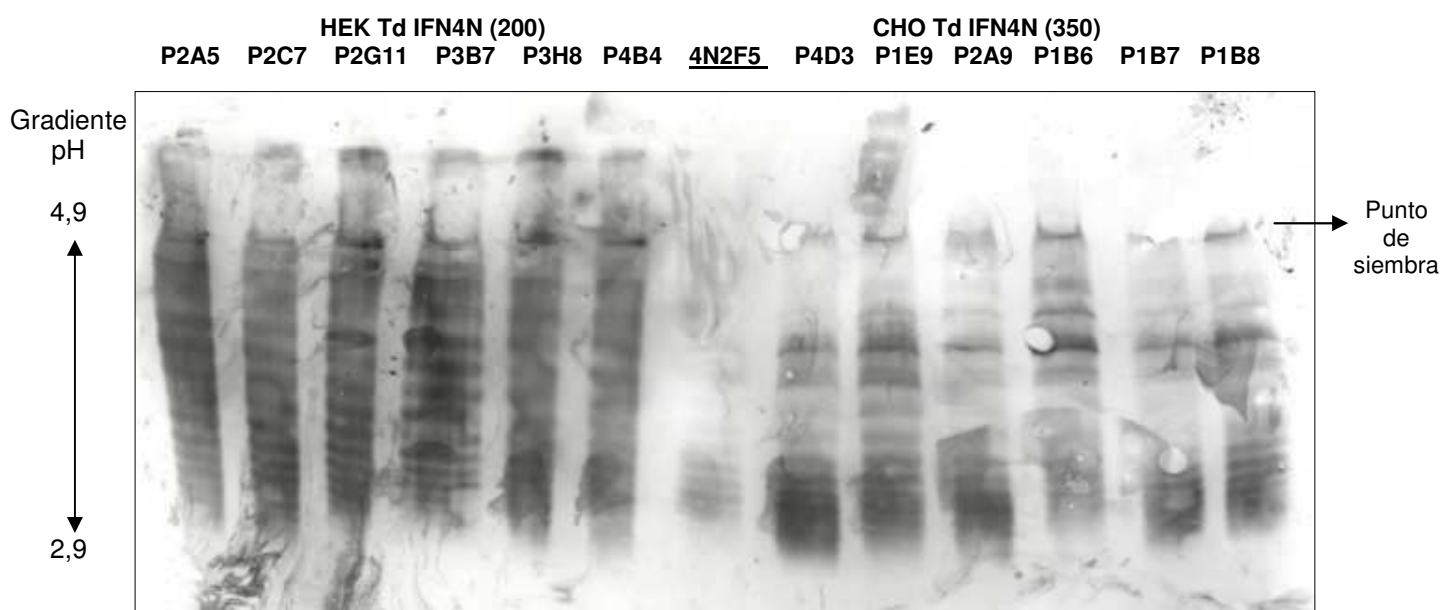


Fig. 27. Grado de glicosilación del IFN4N producido por los clones derivados de CHO Td IFN4N (350) y de HEK Td IFN4N (200). Evaluación mediante IEF/wb

Se evaluó el patrón de glicofomas de diferentes pl del IFN4N producido por los clones derivados de células HEK (izq.) y de células CHO (der.), incluido el clon de referencia 4N2F5 (centro) a los fines de comparar el grado de glicosilación.

1.4.2.2. Evaluación de la ABE antiviral y antiproliferativa *in vitro* del IFN4N producido por los clones derivados de células CHO y HEK

Los ensayos de actividad biológica antiviral y antiproliferativa *in vitro* constituyen una herramienta muy útil para la valoración de las muestras de interés ya que permiten conocer la actividad volumétrica de cada una de ellas. Sin embargo, la comparación entre diferentes muestras debe realizarse teniendo en cuenta la ABE que es propia de cada molécula. Para obtener este dato es necesario realizar la cuantificación de la muestra además de su valoración biológica. En este caso, la cuantificación de las muestras se llevó a cabo empleando un ensayo de ELISA sándwich. Una vez obtenidos ambos datos, la relación entre la actividad volumétrica y la concentración de la muestra permitió definir la ABE de cada muestra, la que fue utilizada con el objetivo de seleccionar el clon capaz de producir la variante con las mejores propiedades biológicas. Además, para el caso de los clones de células CHO se evaluó el grado de similitud entre el IFN4N producido por ellos y, comparativamente, con la molécula producida por el clon de referencia (4N2F5).

Teniendo en cuenta que el ensayo de AB es el que presenta mayor variación interensayo, para cada muestra se calculó la concentración promedio del IFN4N determinada por triplicado mediante técnica de ELISA y con ella se calcularon los valores de ABE a partir de cada determinación de la AB realizada sobre la muestra evaluada por triplicado y en 4 ocasiones diferentes. Para comparar los resultados obtenidos para cada

uno de los clones se utilizó un análisis de la varianza seguido de un test de Tukey, considerando la existencia de diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

En la Fig. 28 se observa que la mayoría de las muestras correspondientes al IFN4N_{CHO} presentaron una ABE antiviral entre 100 y 150 UI.ng⁻¹. Sólo el clon P1E9 evidenció valores superiores a los mencionados para la molécula producida, aunque el análisis estadístico no demostró la existencia de diferencias significativas para ninguno de ellos.

Por otra parte, la mayoría de los clones HEK produjeron una molécula con un valor de ABE antiviral de aproximadamente 200 UI.ng⁻¹. Particularmente, el IFN4N_{HEK} producido por P2A5 presentó uno de los valores más elevados, mientras que el obtenido a partir de P3B7 evidenció el menor valor de ABE antiviral. Comparativamente, los clones celulares derivados de HEK mostraron un promedio de ABE antiviral (215 ± 30 UI.ng⁻¹) mayor que el correspondiente a las moléculas producidas por los clones CHO (128 ± 29 UI.ng⁻¹).

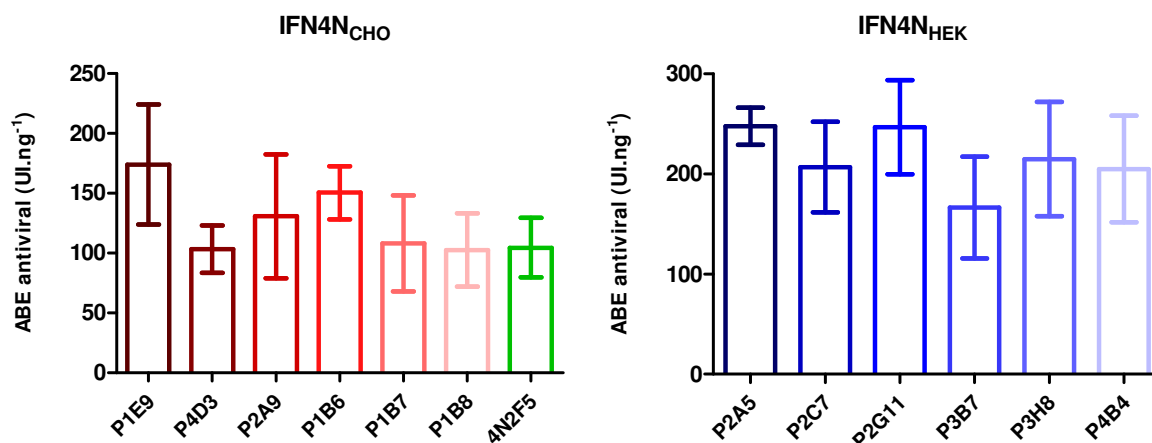


Fig.28. ABE antiviral del IFN4N expresado en el sobrenadante de cultivo de los clones derivados de células CHO y HEK

Se muestra el promedio de los resultados obtenidos en cuatro ensayos independientes \pm SD.

Posteriormente, se determinó la AB antiproliferativa de las moléculas de IFN4N. Para el procesamiento de los datos experimentales, se procedió del mismo modo al llevado a cabo para la determinación de la ABE antiviral. Las muestras de IFN4N_{CHO} demostraron una ABE promedio de 18 ± 4 UI.ng⁻¹, similar al valor obtenido para el clon 4N2F5 (17 ± 5 UI.ng⁻¹). Sólo para el caso de la molécula producida por P1B7 el valor de ABE resultó inferior al resto. Por otra parte, el IFN4N obtenido a partir de los clones de células HEK evidenció una ABE antiproliferativa promedio de 38 ± 5 UI.ng⁻¹, aproximadamente dos veces superior al promedio de ABE del IFN4N producido por células CHO (Fig.29).

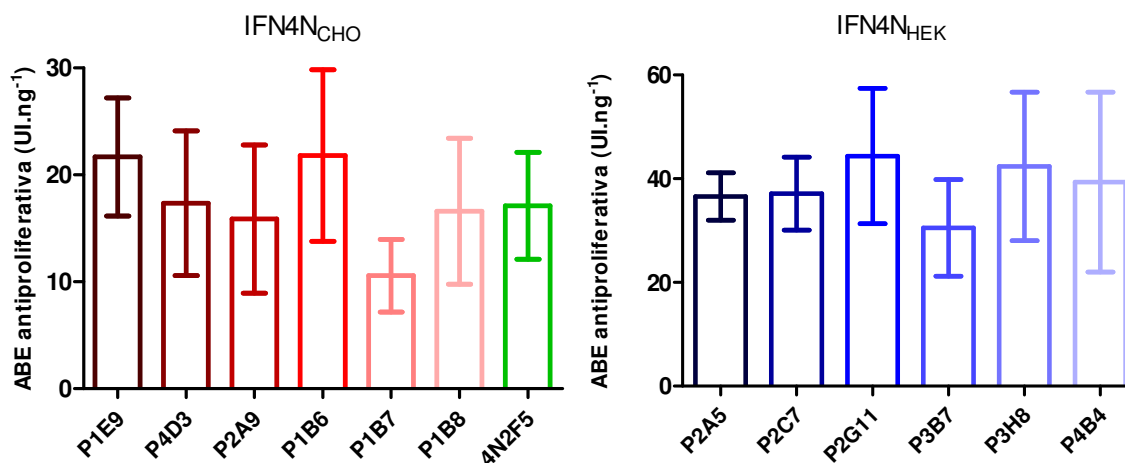


Fig. 29. ABE antiproliferativa del IFN4N expresado en el sobrenadante de cultivo de los clones derivados de células CHO y HEK

Se muestra el promedio de los resultados obtenidos en cuatro ensayos independientes \pm SD.

La diferencia entre los valores de ABE antiviral y antiproliferativa observados para el IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} no son sorprendentes teniendo en cuenta los resultados de la caracterización de diferentes variantes hiperglicosiladas del hIFN- α 2b reportados en trabajos anteriores (Ceaglio, 2008). Además, este resultado es consistente con la bibliografía que describe que la actividad antiviral es inducida a través de la vía clásica JAK/STAT y no requiere altas concentraciones de ligando para alcanzar valores máximos. Se ha observado que, para diferentes especies de IFN α , la activación de esta vía, cuantificada a través de los niveles de fosforilación de las proteínas STAT (particularmente STAT1 y STAT3) se relaciona con la afinidad general de la citoquina por su receptor. Bajas cantidades de factores STAT fosforilados son suficientes para obtener una potente protección antiviral, por lo que no es necesario la activación de múltiples receptores, ni la estabilidad de la unión para alcanzar la saturación de la respuesta de protección antiviral. Contrariamente, la menor ABE antiproliferativa del IFN4N producido por ambos tipos celulares puede ser comprendido teniendo en cuenta que la actividad antiproliferativa del IFN requiere mayores concentraciones de la citoquina, así como la conformación de un complejo ternario estable con las dos subunidades del receptor (IFNAR-1 e IFNAR-2) (Ghislain y col., 1995; Hossler y col., 2009).

Resulta de interés relacionar estos conceptos con las diferencias observadas entre las actividades biológicas de IFN4N_{HEK} e IFN4N_{CHO}. Es probable que tales diferencias, fundamentalmente en la actividad antiproliferativa sean, por lo previamente expuesto, el resultado de una diferente afinidad al receptor por parte de IFN4N.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos a partir de los ensayos de evaluación del crecimiento y producción específica y acumulada de IFN4N y la determinación de la ABE antiviral y antiproliferativa, se postularon los clones CHO Td IFN4N (350) P1B8 y HEK Td IFN4N (200) P2A5 para la producción de IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK}, respectivamente.

1.5. Producción de IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} en condiciones de adherencia

La producción de IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} se realizó mediante el cultivo de los clones CHO Td IFN4N (350) P1B8 y HEK Td IFN4N (200) P2A5, respectivamente, en condiciones de adherencia. En total se llevaron a cabo dos procesos de producción que permitieron obtener dos lotes diferentes para cada proteína. Los resultados obtenidos en cada uno de los mismos fueron muy similares y se presentan a continuación.

Durante la producción mediante el cultivo del clon P1B8 se obtuvieron un total de 18 cosechas (9 por cada frasco) que evidenciaron valores de concentración entre 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y 2,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. En el caso del clon celular HEK P2A5 se obtuvieron 10 cosechas (5 por cada frasco) cuyos valores de concentración oscilaron entre 2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y 4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Tales producciones resultaron entre 14 y 57 veces superiores al comparar las menores y mayores concentraciones alcanzadas durante las diferentes cosechas de ambos clones con las correspondientes al clon de referencia 4N2F5, cuya concentración promedio obtenida en las mismas condiciones de trabajo fue aproximadamente 0,07 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Gugliotta, 2010). Este resultado demuestra la potencialidad del empleo de vectores lentivirales de tercera generación para el desarrollo de líneas celulares productoras y su utilidad para mejorar el sistema de producción.

1.6. Producción y purificación del mAb anti-hIFN- α 2b CA5E6 para su empleo en ensayos de ELISA sándwich, ELISA de competición y cromatografía de inmunoafinidad

El mAb CA5E6, desarrollado previamente en el laboratorio como integrante de un panel de mAbs anti-hIFN- α 2b (Depetris, 2008), fue capaz de reconocer tanto a la variante no glicosilada del IFN (empleada para su generación) como también a diversas variantes glicosiladas e hiperglicosiladas generadas mediante glicoingeniería (Ceaglio y col., 2008; Gugliotta, 2010). Tal capacidad incluye a la variante IFN4N producida en células CHO y HEK. Por este motivo, este anticuerpo fue empleado para la cuantificación y purificación de las muteínas de hIFN- α 2b.

1.6.1 Producción *in vivo* del mAb CA5E6 mediante la obtención de líquido ascítico

El cultivo *in vitro* de hibridomas requiere de condiciones óptimas que permitan a la célula híbrida iniciar su proliferación. Por ello, además de los nutrientes y factores de

crecimiento presentes en el medio de cultivo formulado, se empleó una concentración de 20% (V/V) de SFB y una capa de células alimentadoras o *feeder layer*. Esta última se obtuvo a partir de células del bazo de un ratón de la cepa Balb/c el día previo al descongelamiento del hibridoma productor del mAb CA5E6.

Los hibridomas fueron amplificados en cultivo hasta alcanzar una densidad celular que permitió llevar a cabo la inoculación de ratones Balb/c. Durante este período de amplificación se verificó el título de anticuerpos en el sobrenadante de cultivo mediante ELISA específico indirecto.

Para la producción de líquido ascítico se empleó un lote de 20 ratones Balb/c que fueron inicialmente inoculados por vía intraperitoneal con 0,5 ml de Pristane. Una vez transcurridos 10 días, se realizó la inoculación intraperitoneal con entre 2 y $5 \cdot 10^6$ hibridomas por animal. En total se recolectaron 75 ml de líquido ascítico conteniendo aproximadamente $12 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ del mAb específico anti-hIFN- $\alpha 2b$.

1.6.2. Purificación del mAb CA5E6 por cromatografía de afinidad a proteína A

Durante el transcurso de la tesis, el mAb CA5E6 fue empleado con diferentes propósitos, motivo por el cual se llevaron a cabo repetidos procedimientos de purificación a los fines de obtener cantidades suficientes del mismo. A modo de ejemplo, se describen los resultados obtenidos utilizando una columna XK 16/20 conteniendo 5 ml de resina en un cromatógrafo ÄKTA Purifier. En la Fig. 30 se presenta el cromatograma de purificación, en el cual se incluye una ampliación correspondiente al pico de elución.

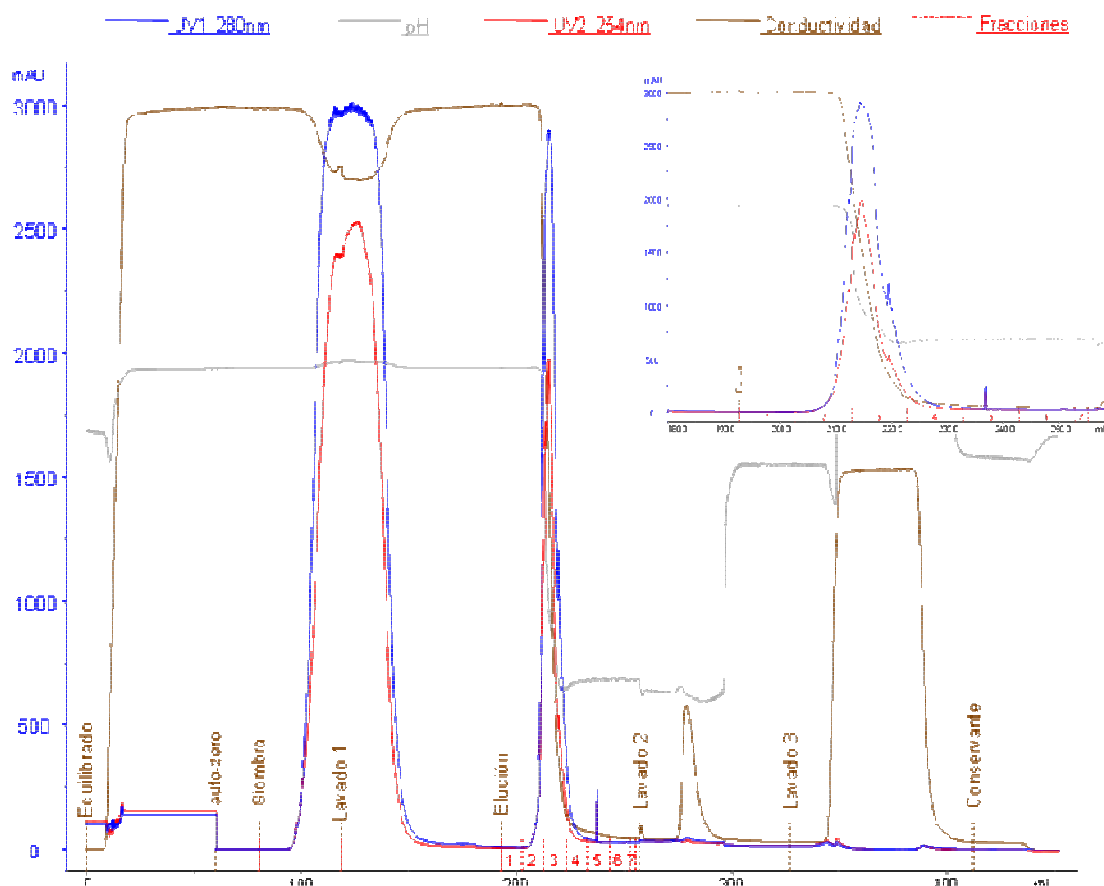


Fig. 30. Purificación del mAb CA5E6 mediante cromatografía de inmunoadinidad a proteína A

El mAb CA5E6 fue purificado a partir de ascitis murina. En el perfil cromatográfico se muestran los registros de absorbancia a 280 nm (rojo), absorbancia a 260 nm (azul), conductividad (marrón) y fracciones recolectadas (barras verticales en línea recortada). En la esquina superior derecha se muestra una ampliación del pico de elución.

Las fracciones 2, 3 y 4 se juntaron para así conformar el *pool* de elución. La presencia de Igs en las fracciones provenientes de cada uno de los pasos del proceso de purificación fue evaluada mediante cuantificación empleando un ELISA sándwich. Los resultados permitieron calcular la recuperación de mAb CA5E6 (Tabla IV).

Tabla IV. Rendimiento de la purificación del mAb CA5E6 a partir de ascitis murina mediante cromatografía de afinidad a proteína A

Muestra	Volumen (ml)	Concentración (mg.ml ⁻¹)	Masa (mg)	Recuperación (%)
Siembra	5	2,4	12	100
Flowthrough (FT)	5	8.10 ⁻⁵	4.10 ⁻⁴	D
Lavado	25	1,5.10 ⁻²	4.10 ⁻¹	3
Pool elución	14,5	7,6.10 ⁻¹	11	92

D: Valor despreciable

Posteriormente, el *pool* de elución fue dializado contra PBS y posteriormente analizado mediante SDS-PAGE seguido de tinción con azul brillante de *Coomasie* para evaluar la pureza del anticuerpo (Fig. 31).

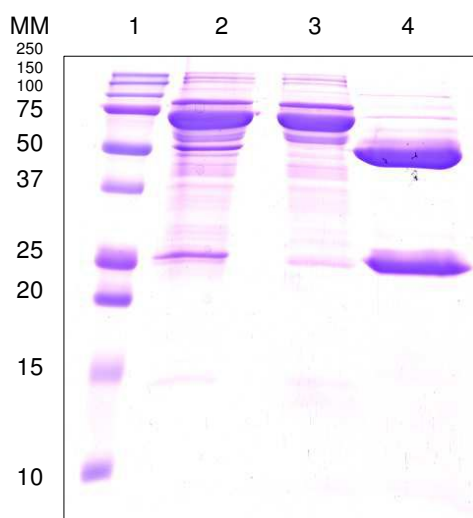


Fig. 31. Evaluación de la pureza del mAb CA5E6 obtenido a partir de ascitis murina y sometido a purificación mediante cromatografía de afinidad a proteína A.

Las fracciones correspondientes al pico de elución del mAb anti-rhIFN- α 2b (2, 3 y 4) se mezclaron, dializaron y analizaron mediante técnica de SDS-PAGE en condiciones reductoras y posterior tinción con azul brillante de *Coomasie*.

Calles: 1: Marcador de masa molecular
 2: Ascitis
 3: FT
 4: Lavado
 5: *Pool* elución mAb CA5E6

La pureza del mAb en el *pool* de elución fue del 95% calculada mediante densitometría de bandas.

El procedimiento de purificación por cromatografía de afinidad a proteína A fue reiterado en diferentes oportunidades, permitiendo obtener el mAb CA5E6 con una muy buena recuperación y un elevado grado de pureza, condiciones adecuadas para continuar con la etapa siguiente de preparación de la matriz de inmunoafinidad.

1.7. Purificación de IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} mediante cromatografía de inmunoafinidad

La purificación del IFN4N obtenido a partir de células HEK y células CHO fue llevada a cabo mediante cromatografía de inmunoafinidad, empleando el mAb CA5E6 acoplado a una matriz de *Sepharose*[®]. El protocolo de purificación empleado fue llevado a cabo de acuerdo a las condiciones establecidas previamente (Ceaglio, 2008) e indicadas en M&M.

1.7.1 Inmovilización del mAb CA5E6 a una resina de *Sepharose*TM activada con CNBr. Cálculo de la capacidad teórica y dinámica de la matriz

Se prepararon 5 ml de resina para cada una de las moléculas a purificar. Teniendo en cuenta que el fabricante recomienda emplear 5 mg de mAb por cada ml de resina, en total se emplearon 50 mg de anticuerpo, obteniéndose un rendimiento de acoplamiento del 82%.

La capacidad teórica de la resina se calculó teniendo en cuenta la masa de anticuerpo efectivamente inmovilizado y considerando que cada molécula de mAb (150 kDa) es capaz de ligar, por lo menos, a una molécula de hIFN- α 2b no glicosilado (19 kDa). Por lo tanto, 20,5 mg de anticuerpo (0,13 μ mol) serían capaces de unir a 0,13 μ mol de hIFN- α 2b no glicosilado. Considerando una masa molecular de 19 mg. μ mol⁻¹, sería posible asumir una capacidad teórica de la resina de por lo menos 2,5 mg de hIFN- α 2b no glicosilado, es decir, 0,5 mg por ml de resina.

Para realizar el cálculo de la capacidad dinámica de la matriz se empleó 1 ml de la misma y se trabajó en el modo de cromatografía frontal. La concentración de la siembra fue de 5,3 μ g.ml⁻¹, calculada por ELISA de competición (en la segunda parte de los resultados se describe la importancia del ELISA de competición en etapas de cuantificación debido a que el ELISA sándwich produce una subvaloración correspondiente a 4 y 5 veces del valor real). Se sembraron 152 ml conteniendo un total de 806 μ g de IFN4N, superando ampliamente la capacidad teórica de la matriz. El *FT* se recolectó en fracciones de 3 ml que posteriormente se analizaron mediante ELISA de competición.

A partir de los datos de concentración de IFN4N presente en el *FT*, se graficó la relación C/C₀, en función de la masa ofrecida, donde C representa la concentración de IFN4N para cada una de las fracciones analizadas y C₀ corresponde a la concentración de IFN4N en la muestra sembrada (Fig. 32).

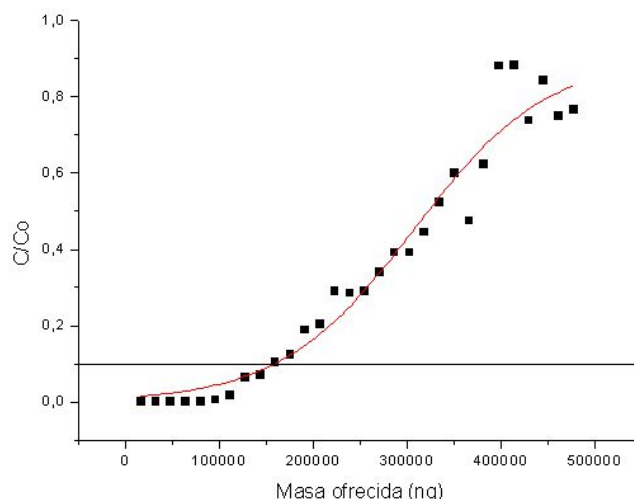


Fig. 32. Determinación de la capacidad dinámica mediante cromatografía frontal

Se construyó la curva de *breakthrough* para evaluar la capacidad dinámica de la matriz para purificar IFN4N por cromatografía de inmunoafinidad.

La capacidad dinámica de la matriz de inmunoafinidad CA5E6, calculada al 10% de la relación C/C_0 , fue 158 μg de IFN4N. Teniendo en cuenta que la capacidad teórica de la columna es de 500 μg de IFN4N podemos concluir que la capacidad dinámica o experimental es el 32% de la capacidad teórica. Esta capacidad experimental puede expresarse también como 158 μg IFN4N. ml^{-1} de gel húmedo. A partir de estos datos se decidió trabajar sembrando una masa de IFN que no supere la capacidad dinámica calculada.

1.7.2. Purificación de IFN4N producido por los clones de células CHO y HEK

La obtención del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} con un elevado grado de pureza constituyó una etapa fundamental para poder llevar a cabo la caracterización completa de ambas moléculas que involucra el análisis de la glicosilación, actividad biológica *in vitro*, farmacocinética y actividad biológica *in vivo*; incluyendo la purificación de las muteínas que forman parte del segundo capítulo de la presente tesis.

La purificación del IFN4N a partir de sobrenadantes de cultivo se realizó empleando la matriz CA5E6-*Sepharose* preparada previamente. Para cada una de las moléculas a purificar se destinaron 5 ml de matriz que fueron empleadas repetidas veces (entre 3 y 4) con el objetivo de obtener una masa de 2 a 3 mg de cada proteína. En la Fig. 33 y 34 se muestran como ejemplo uno de los cromatogramas obtenidos luego la purificación del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK}, respectivamente.

Las purificaciones fueron evaluadas mediante ELISA sándwich y SDS/PAGE seguido de tinción con azul brillante de *Coomassie*. Los datos obtenidos a partir del primer ensayo permitieron calcular una recuperación superior al 80% para las dos proteínas

evaluadas (Tabla V). El segundo ensayo permitió evaluar el grado de pureza del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} siendo de 98% y 92%, respectivamente.

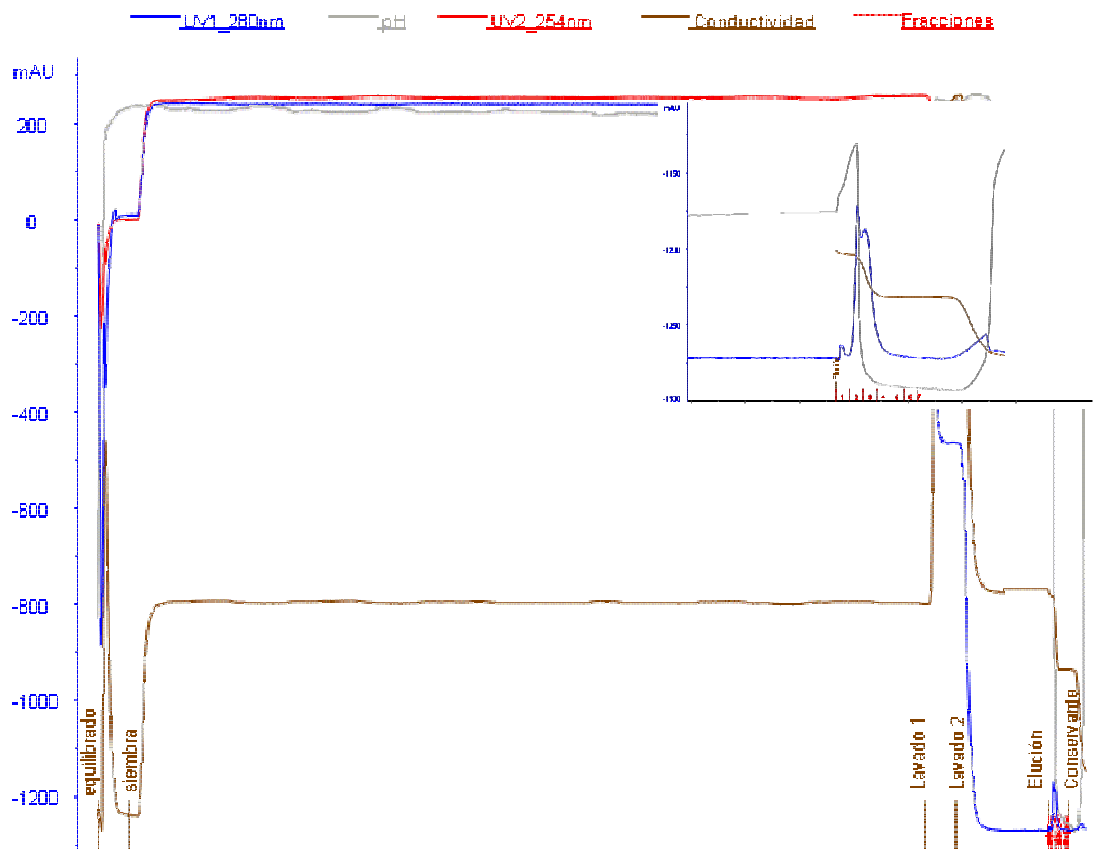


Fig. 33. Purificación de IFN4N_{CHO} mediante cromatografía de inmunofinidad

Se muestra el cromatograma correspondiente a la purificación de la molécula presente en el sobrenadante de cultivo de las cosechas obtenidas durante la etapa de producción. Se observan los registros de absorbancia a 280 nm (rojo), absorbancia a 260 nm (azul), conductividad (marrón) y fracciones recolectadas (barras verticales en línea recortada). En la esquina superior derecha se muestra una ampliación del pico de elución.

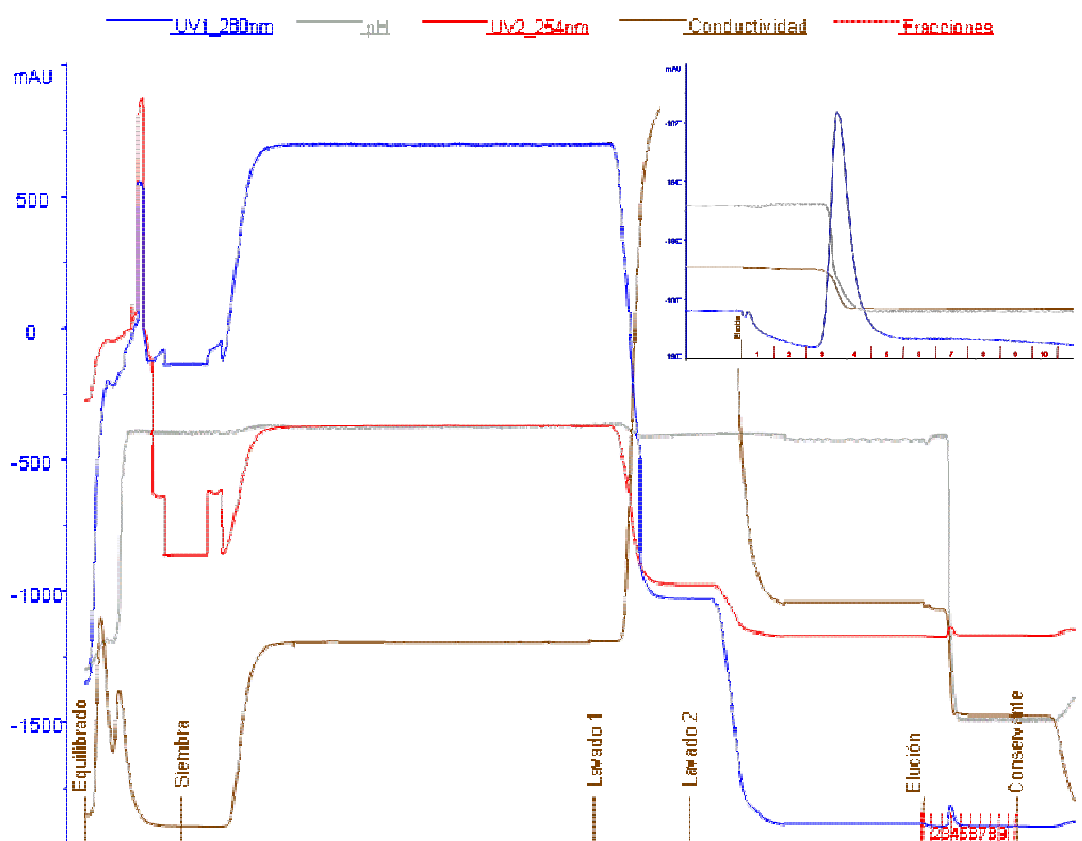


Fig. 34. Purificación de IFN4N_{HEK} mediante cromatografía de inmunoafinidad

Se muestra el cromatograma correspondiente a la purificación de la molécula presente en el sobrenadante de cultivo de las cosechas obtenidas durante la etapa de producción. Se muestran los registros de absorbancia a 280 nm (rojo), absorbancia a 260 nm (azul), conductividad (marrón) y fracciones recolectadas (barras verticales en línea recortada). En la esquina superior derecha se muestra una ampliación del pico de elución.

Tabla V. Cálculo de la recuperación (R) de las purificaciones del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} mediante cromatografía de inmunoafinidad

IFN4N _{CHO}				
Muestra	Volumen (ml)	Concentración (µg.ml ⁻¹)	Masa (µg)	R (%)
Siembra	245	2,9	710	100
FT	245	5,5.10 ⁻²	14	2
Lavados	65	0,1	7	1
Elución	10,5	63	683	93
IFN4N _{HEK}				
Muestra	Volumen (ml)	Concentración (µg.ml ⁻¹)	Masa (µg)	R (%)
Siembra	110	2,4	264	100
FT	110	1,1.10 ⁻²	1,2	0,5
Lavados	65	0,4.10 ⁻²	0,3	0,1
Elución	10,5	22	231	88

La determinación de la concentración de IFN4N en las diferentes fracciones del proceso de purificación se realizó mediante técnica de ELISA sándwich.

1.8. Caracterización de las moléculas IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} purificadas

1.8.1. Caracterización fisicoquímica

La caracterización fisicoquímica de las moléculas purificadas de IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} fue llevada a cabo mediante ensayos de SDS-PAGE e IEF seguidos de tinción con el colorante azul brillante de *Coomassie*.

Mediante el ensayo de SDS-PAGE realizado en condiciones reductoras, se analizaron las muestras de IFNwt e IFN4N derivado de células CHO y HEK antes y luego de ser sometidos a digestión con PNGasa F, que escinde los glicanos unidos mediante enlaces de tipo N (Fig. 35). La ausencia de N-glicanos unidos al hIFN- α 2b fue confirmada mediante la comparación entre las calles 2 y 3 de la mencionada Fig. La diferencia observada entre el IFNwt y la variante no glicosilada (IFN-NG) se atribuyó a la presencia de O-glicanos unidos a la Thr106 de la molécula nativa. Por otra parte, para el IFN4N_{HEK} e IFN4N_{CHO} sin digestión (calles 4 y 6, respectivamente) se visualizó una zona de gran heterogeneidad en relación a la posición y a la cantidad de las bandas distribuidas a lo largo de un rango de masas moleculares comprendidas entre 25 y 45 kDa. Además se evidenció la presencia de una banda de aproximadamente 21,5 kDa para ambas moléculas purificadas, la cual coincidió en posición con la banda correspondiente al IFNwt o a las bandas N-deglicosiladas.

Por otro lado, se observó una notable diferencia entre la masa molecular aparente máxima alcanzada por las moléculas de IFN4N producidas en distintos huéspedes. Particularmente, el IFN4N_{CHO} presentó una masa molecular aparente máxima de aproximadamente 57 kDa mientras que para el IFN4N_{HEK} fue de aproximadamente 52 kDa. La variante producida en células CHO presentó una distribución de bandas heterogénea, mayormente concentrada hacia las zonas de masas moleculares superiores a 40 kDa. La variante producida en células HEK presentó una distribución de bandas más homogénea, las cuales se ubicaron uniformemente repartidas entre los 25 y 45 kDa. Todos estos resultados permitieron concluir que la masa molecular aparente media del IFN4N_{HEK} resultó inferior a la observada para el IFN4N_{CHO}. En general se ha observado que las proteínas producidas a partir de células CHO poseen una masa molecular promedio superior respecto de su contraparte producida en HEK (Suen y col., 2010; Wang y col., 2015). Luego de la digestión con PNGasa F, tanto el IFN4N_{HEK} como el IFN4N_{CHO} (calles 5 y 7, respectivamente) se redujeron a una banda principal de aproximadamente 21-22 kDa, que se correspondió con la variante nativa del hIFN- α 2b. Notablemente, luego de la digestión de la variante producida en células HEK con la enzima N-deglicosidasa se visualizó la aparición de una banda correspondiente con el IFN-NG, la cual no fue observada en el producto de la digestión de la molécula derivada de células CHO. Este resultado sugiere la presencia de variantes de IFN4N_{HEK} que portan glicanos de tipo N pero no de tipo O. Teniendo en cuenta que ambas proteínas presentan la misma secuencia aminoacídica, los resultados obtenidos

permiten confirmar que los glicanos son los principales responsables de las diferencias en las masas moleculares aparentes y en la heterogeneidad visualizada entre ambas moléculas. La misma observación fue realizada en un trabajo previo en el cual se analizaron 12 glicoproteínas, confirmándose que las diferencias entre las masas moleculares aparentes de una misma proteína producida en dos linajes celulares diferentes se debían al contenido de glicanos (Croset y col., 2012).

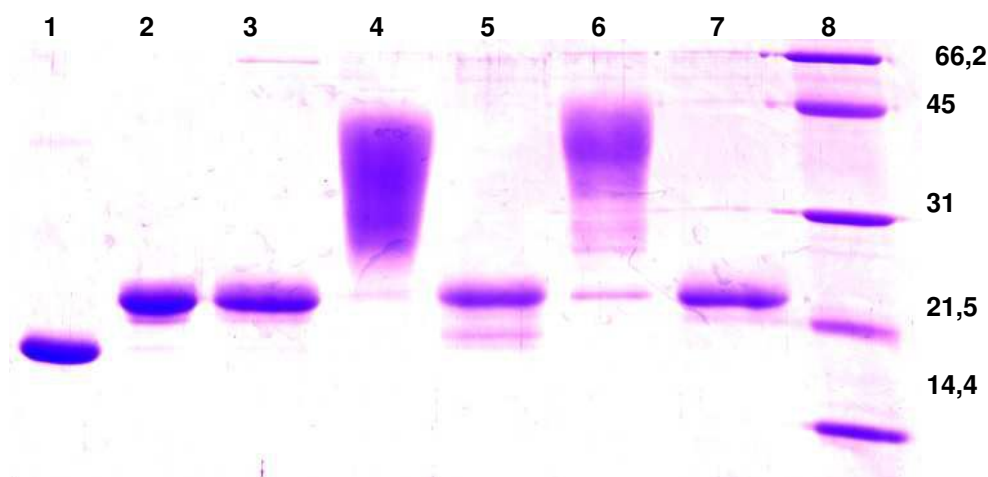


Fig. 35. Comparación de la masa molecular aparente del IFN4N_{HEK} e IFN4N_{CHO} mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras. Análisis de las muestras pre y postdigestión con PNGasa F

Este ensayo permitió evaluar la masa molecular aparente del IFN4N_{HEK} e IFN4N_{CHO} comparativamente con las variantes IFN-NG e IFNwt. Además, la digestión con PNGasa F permitió confirmar la influencia que tienen los glicanos en la heterogeneidad de los IFN4N producidos en ambos huéspedes.

Calles: 1: IFN-NG
 2: IFNwt
 3: IFNwt N-deglicosilado
 4: IFN4N_{HEK}
 5: IFN4N_{HEK} N-deglicosilado
 6: IFN4N_{CHO}
 7: IFN4N_{CHO} N-deglicosilado
 8: Marcador de masa molecular

Por otra parte se llevó a cabo un ensayo de IEF en el cual las diferentes isoformas de pl del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} fueron sometidas a migración en un gel con un gradiente de pH entre 2,9 y 4,9 (Fig. 36). Se observó que las variantes hiperglicosiladas presentaron una cantidad de isoformas muy superior a la evidenciada por la variante no glicosilada (calle 1) y la nativa (calle 2) del hIFN- α 2b. Específicamente, el IFNwt presentó un mayor número de isoformas que el IFN-NG, lo cual es coherente ya que esta última no se encuentra glicosilada, mientras que la anterior presenta sólo un sitio de O-glicosilación. Al comparar el IFN4N_{CHO} con el IFN4N_{HEK} se observó que ambas moléculas presentaron isoformas repartidas a lo largo de todo el gradiente de punto isoeléctrico. Mientras que la variante

proveniente de células humanas presentó isoformas uniformemente repartidas a lo largo de todo el gradiente de pH, la variante derivada de células CHO se concentró principalmente hacia la zona ácida del gel. Además, esta última presentó isoformas más ácidas respecto del IFN4N_{HEK}, que no pudieron ser resueltas correctamente debido a limitaciones de la metodología. Estos resultados son comparables con los reportados para la rhEPO (Zhang y col., 2010). Por un lado la hormona derivada de células CHO evidenció un perfil del glicofomas principalmente concentradas hacia la zona más ácida del gradiente, indicando la presencia de isoformas altamente glicosiladas y, a su vez, con un elevado contenido de ácido siálico responsable de la mayor acidez demostrada. Por otro lado, la variante producida en HEK presentó una gran variedad de isoformas ampliamente distribuidas a lo largo de todo el gradiente de pH. Otro comportamiento similar fue reportado para una molécula derivada de células gliales con función de adhesión celular denominada GlialCAM que fue producida en células CHO y HEK, observándose una distribución de isoformas en IEF muy similar al resultado presentado en esta tesis (Gaudry y col., 2008).

En general, los resultados de esta caracterización son congruentes con lo que se observa en la bibliografía ya que, cuando una misma proteína es producida en células CHO y HEK, la variante derivada de células de hámster presenta una masa molecular aparente superior así como también un mayor contenido de isoformas más ácidas (Suen y col., 2010; Wang y col., 2015).

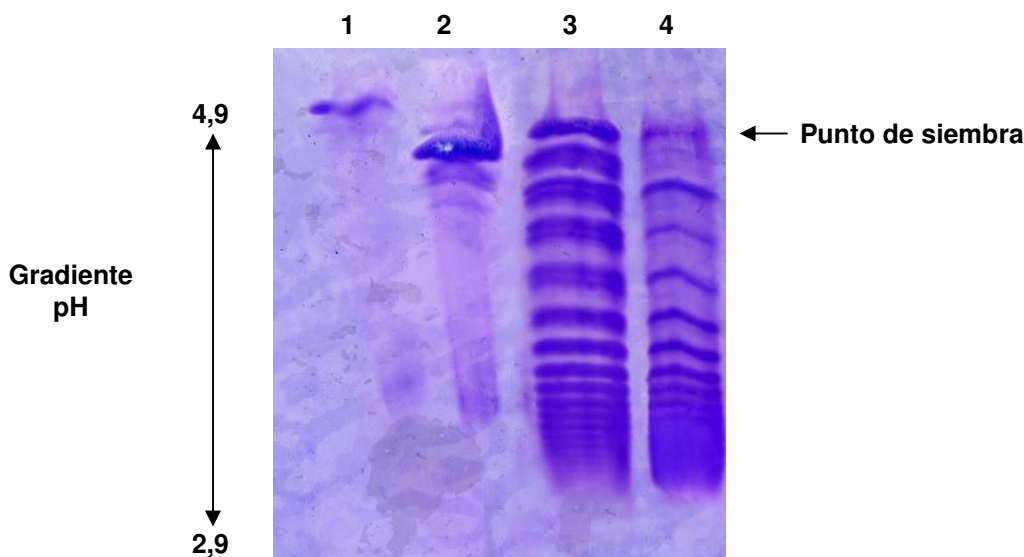


Fig. 36. Análisis del patrón de isoformas de diferente pI y su distribución a lo largo del gradiente de pH establecido en ensayos de IEF

Se comparó el patrón de isoformas del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} entre sí y con respecto a las moléculas de IFNwt e IFN-NG.

Calles:
 1: IFN-NG
 2: IFNwt
 3: IFN4N_{HEK}
 4: IFN4N_{CHO}

1.8.2. Análisis glicosídico del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK}

La caracterización fisicoquímica del IFN4N producido en células CHO y HEK permitió concluir que las diferencias entre ellos están dadas principalmente por la presencia de glicanos que aportan distintas características de acuerdo con su composición. Teniendo en cuenta que la secuencia aminoacídica de ambas proteínas es la misma y, en consecuencia, los sitios potenciales de N- y O-glicosilación también, las principales diferencias podrían deberse a la diferente ocupación de sitios y/o a la estructura de los glicanos, este último fenómeno conocido como microheterogeneidad (Sola y Griebenow, 2010). Además, otros autores ya han descrito la existencia de marcadas diferencias en el grado de glicosilación de diferentes proteínas producidas en células derivadas de hámster y de humanos (Suen y col., 2010; Croset y col., 2012; Go y col., 2013).

1.8.2.1. Determinación del contenido de ácido siálico presente en el IFN4N_{HEK} e IFN4N_{CHO}

El contenido de ácido siálico de las glicoproteínas es una característica muy importante ya que contribuye a prolongar su tiempo de vida media plasmática y, en consecuencia, permite mejorar las propiedades farmacocinéticas de las proteínas. Sin embargo, cuando el huésped de producción empleado no es de origen humano, como en el caso de las células CHO, deben controlarse las cantidades de la variante de ácido siálico denominada Neu5Gc, que resulta un epítopo inmunogénico para humanos. Se ha descrito que la presencia de Neu5Gc conduce a la producción de anticuerpos neutralizantes específicos que pueden llevar al fracaso de la terapia (Jenkins y col., 1996; Gaudry y col., 2008; Ghaderi y col., 2012).

El ácido siálico escindido de las variantes de IFN4N mediante hidrólisis ácida fue evaluado mediante cromatografía de intercambio aniónico a pH elevado, empleando un detector electroquímico de pulso amperométrico (HPAEC-PAD). El resultado coincidió con las observaciones realizadas durante la caracterización fisicoquímica que indicaban un mayor contenido de isoformas acídicas para la variante IFN4N_{CHO}, la cual en este caso evidenció un contenido de Neu5Ac significativamente superior respecto del valor obtenido para el IFN4N_{HEK} (Fig. 37). Otras moléculas han demostrado diferencias en el contenido de ácido siálico cuando son producidas en huéspedes humanos o en huéspedes derivados de hámster (Sola y Griebenow, 2010; Croset y col., 2012; Go y col., 2013; Butler y Spearman, 2014).

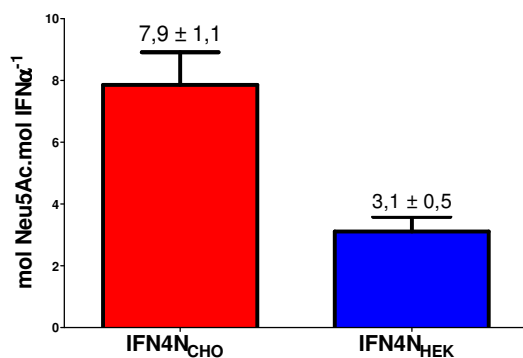


Fig. 37. Contenido de ácido siálico de IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK}

Las muestras fueron sometidas a hidrólisis ácida y posteriormente evaluadas mediante HPAEC-PAD.

Teniendo en cuenta que el límite de detección del ácido siálico con características inmunogénicas (Neu5Gc) establecido para esta metodología es 0,6 pmoles, es importante mencionar que no se detectó su presencia en la muestra proveniente de células HEK. Contrariamente, un 0,9% de Neu5Gc ($0,07 \pm 0,02$ mmol por mol de proteína) fue observado para la variante producida en células CHO. Este resultado fue consistente con la ausencia de Neu5Gc en la molécula de rhEPO producida en células humanas HT-1080 (DynepoTM, Shahrokh y col., 2010).

1.8.2.2. Análisis de la composición de monosacáridos característica de los glúcidos del IFN4N derivado de células CHO y HEK

Con el fin de avanzar en la descripción de la composición y el contenido de las estructuras glicosídicas que conforman los oligosacáridos del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK}, se analizaron los monosacáridos neutros (Gal, Man y Fuc) liberados mediante hidrólisis con TFA y los monosacáridos aminados (GlcNAc y GalNAc) escindidos mediante hidrólisis con HCl. El análisis posterior mediante HPAEC-PAD demostró la misma proporción de Man y Fuc así como también de GlcNAc y GalNAc en relación molar al comparar las moléculas de IFN producidas en ambos huéspedes celulares. Sin embargo, la principal diferencia entre ellas se visualizó en el contenido de Gal. IFN4N_{CHO} evidenció un contenido de Gal aproximadamente 4 veces mayor respecto del IFN4N_{HEK}. Este resultado indicaría la presencia de estructuras más ramificadas en la molécula generada en células CHO. Asimismo, podría indicar la presencia de estructuras truncas entre los glicanos de la variante producida en células HEK, es decir, estructuras cuyo monosacárido terminal es una GlcNAc. Es importante aclarar que si bien el IFN4N se encuentra altamente N-glicosilado, la presencia de GalNAc se debe a la O-glicosilación de la Thr106 en ambos IFN (Tabla VI).

Tabla VI. Análisis del contenido y composición de monosacáridos en las estructuras glicosídicas del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK}

Monosacáridos (MS)	IFN4N _{HEK}			IFN4N _{CHO}		
	(mol MS.mol IFN ⁻¹)					
GalNAc	1,1	±	0,3	0,8	±	0,01
GlcNAc	13,2	±	1,9	12,9	±	2,5
Fuc	1,1	±	0,4	1,6	±	0,4
Gal	3,0	±	0,4	11,2	±	1,1
Man	5,1	±	0,6	5,7	±	0,1

1.8.2.3. Comparación de glicanos neutros y cargados presentes en el IFN4N_{HEK} e IFN4N_{CHO}

Los N-glicanos del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} marcados con el fluoróforo 2-AB fueron analizados mediante cromatografía de intercambio aniónico débil, de manera de conocer la proporción de estructuras neutras, mono, bi, tri y tetrasiladas así como también estructuras de alta manosa fosforiladas (HMP). La identificación de estructuras se realizó en función de un estándar basado en el empleo de la proteína fetuina, cuyas estructuras se encuentran ampliamente descriptas (Fig. 38).

El IFN4N_{HEK} exhibió una elevada proporción de glicanos neutros y monosialilados (68%) mientras que el IFN4N_{CHO} evidenció una mayor proporción de especies bi- tri- y tetrasiladas que en conjunto constituyeron un 79% del total de los glicanos. La mayor diferencia entre los IFN4N se visualizó a nivel de los glicanos neutros que representaron casi el 50% de los oligosacáridos del IFN_{HEK} contra un 6% de glicanos neutros presentes en el IFN_{CHO} (~8 veces menor, Fig. 38, Tabla VII). En los cromatogramas de ambas muestras se observó la presencia de un grupo de picos que eluyeron al mismo tiempo de retención que los estándares de glicanos de HMP. La presencia de este tipo de estructuras fue reportada en un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio para el IFN4N_{CHO}, en el cual la muestra fue analizada mediante HPAEC-PAD (Ceaglio y col., 2010) y fue también descripto en glicoproteínas terapéuticas producidas en el mismo tipo de células (Grampp y Ramanan, 2015).

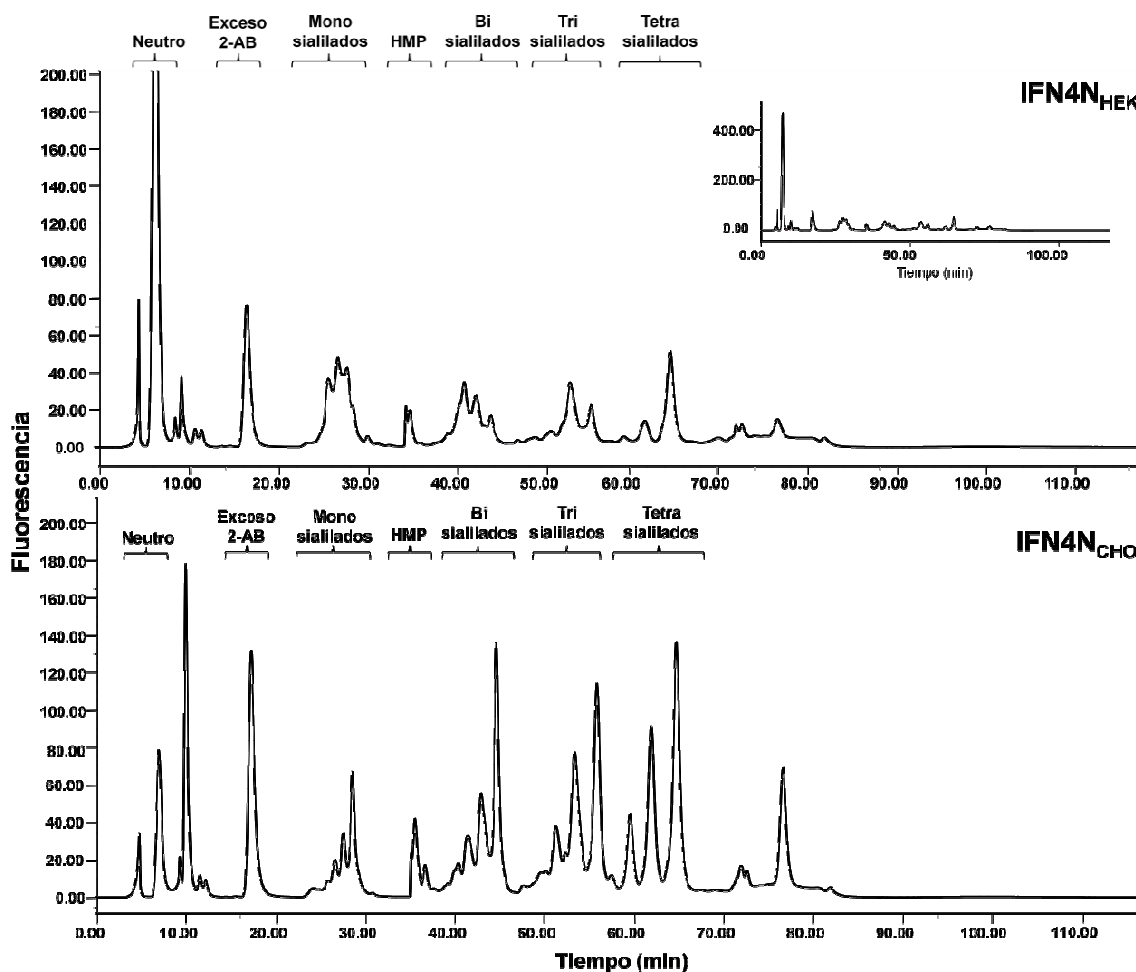


Fig. 38. Análisis de glicanos neutros y cargados en muestras de IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK}

Los glicanos del IFN4N producido en células CHO y HEK fueron marcados con el fluoróforo 2-AB y posteriormente analizados mediante cromatografía de intercambio aniónico débil. El cromatograma de cada una de las muestras fue analizado en comparación con los tiempos de retención observados para fetuina. En la esquina superior derecha se muestra el cromatograma obtenido a partir de los glicanos del IFN4N_{HEK} cuyo eje de ordenadas se representa en escala completa, de manera de visualizar la totalidad del pico correspondiente a las estructuras neutras.

Por un lado, en el cromatograma obtenido a partir de los glicanos provenientes del IFN4N_{CHO} se observó que en los distintos grupos diferenciados por la carga o el contenido de ácido siálico, el pico más abundante coincidió con el ubicado en último lugar (de izquierda a derecha). En cada uno de los grupos mencionados, el pico indicado correspondería a estructuras mono, bi, tri y tetraantenarias completamente terminadas en ácido siálico. Los demás picos observados dentro de cada grupo podrían ser atribuidos a estructuras de mayor tamaño (en UG) y con el mismo grado de sialidación. Específicamente, podrían ser estructuras conteniendo extensiones LacNAc o bien estructuras de mayor antenaridad pero que no se encuentran completamente sialiladas. La identificación de este tipo de estructuras dentro de cada grupo se llevó a cabo mediante comparación con el

resultado obtenido para estándares de glicanos y sobre la base de lo reportado por la bibliografía (Llop y col., 2008).

Por otro lado, en los grupos de glicanos bisialilados y trisialilados del IFN4N_{HEK} se observó que los picos más abundantes correspondían al primero de cada grupo (de izquierda a derecha). Esto indicaría la presencia de una elevada proporción de estructuras cuyo grado de sialidación es incompleto, a diferencia de los resultados mostrados por el IFN4N_{CHO}. Sin embargo, el grupo de estructuras tetrasialiladas de los glicanos de HEK evidenciaron un perfil similar al observado para los glicanos provenientes de IFN4N_{CHO}.

Tabla VII. Contenido de estructuras glicosídicas neutras y cargadas para el IFN4N_{HEK} e IFN4N_{CHO}

Glicanos (%)	IFN4N_{HEK}	IFN4N_{CHO}
Neutros	49	6
Monosialilados	19	11
Alta Manosa 5-,6-fosfato (HMP)	2	4
Bisialilados	14	23
Trisialilados	9	30
Tetrasialilados	7	26

Los resultados obtenidos mediante el análisis de las estructuras neutras y cargadas para el IFN4N son coherentes con evidencias reportadas previamente en la bibliografía, las cuales indican un mayor contenido de glicanos sialilados para las moléculas producidas en células CHO en comparación con las derivadas de HEK. Tal es el caso de la tirotopina humana (hTSH) y la variante soluble de la molécula de adhesión intracelular 1 (sICAM-1) (Grossmann y col., 1995; Bloom y col., 1996; Otto y col., 2004). Lo mismo ocurre al comparar proteínas derivadas de células de hámster con sus contrapartes purificadas a partir de tejido hipofisario, como por ejemplo la prolactina humana (hPRL) (Capone y col., 2015).

1.8.2.4. Análisis de N-glicanos provenientes del IFN4N_{HEK} e IFN4N_{CHO} mediante cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC) y espectrometría de masas. Análisis de las muestras luego de la digestión con enzimas exoglicosidasas

Los glicanos derivados de IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} marcados con el fluoróforo 2-AB fueron analizados mediante HILIC-UPLC (Fig. 39) seguido de espectrometría de masas.

A partir del cromatograma obtenido, los picos principales fueron identificados con el tiempo de retención correspondiente. En la tabla VIII se muestran las (UG) calculadas para cada uno de los picos predominantes, el m/z observado y teórico, la estructura asignada y el porcentaje de abundancia correspondiente. En el anexo ubicado al final del manuscrito se puede observar la representación gráfica de cada estructura.

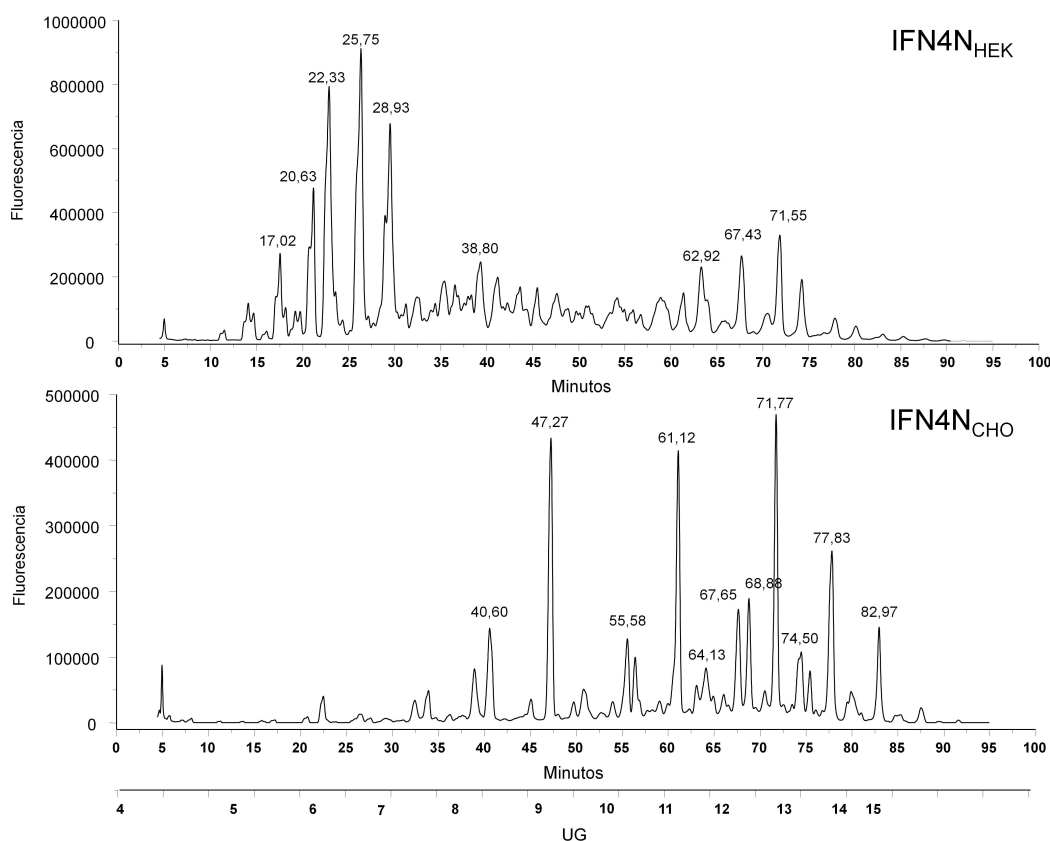


Fig. 39. Análisis de N-glicanos derivados del IFN4N_{HEK} e IFN4N_{CHO} mediante HILIC-UPLC

Se muestra el cromatograma correspondiente graficando la fluorescencia en función de los tiempos de retención o de UG. Asimismo en la parte superior de los picos predominantes se indica el tiempo de retención de los glicanos presentes en ellos.

Tabla VIII. Análisis de los N-glicanos derivados del IF4N_{HEK} e IFN4N_{CHO}

IFN4N _{HEK}						
Estructura	UG	m/z observado	m/z teórico	Error [#] (ppm)	Abundancia* (%)	TR
A2	5,41	n/d	1436,476	n/d	4	17,02
FA2	5,87	n/d	1582,534	n/d	6	20,63
FA2B/FA3	6,24	1785,657	1785,613	25	13	22,33
FA2G1	6,70	n/d	1744,587	n/d	14	25,75
FA2BG1	7,08	1947,709	1947,666	22	13	28,93
FA2G2S1	8,34	n/d	2197,735	n/d	4	38,80
FA4G4S2	11,65	3219,118	3219,095	7	4	62,92
FA4G4S3	12,18	3510,183	3510,190	-2	4	67,43
FA4G4S4	12,70	3801,310	3801,286	6	4	71,55
IFN4N _{CHO}						
Estructura	UG	m/z observado	m/z teórico	Error [#] (ppm)	Abundancia* (%)	TR
FA2G2S1	8,78	2197,792	2197,735	26	5	40,60
FA2G2S2	9,11	2488,910	2488,910	0	12	47,27
FA3G3S2	10,32	2853,993	2853,963	11	4	55,58
FA3G3S3	11,14	3145,100	3145,058	13	12	61,12
FA4G4S2	11,65	3219,104	3219,095	3	4	64,13
FA4G4S3	12,18	3510,230	3510,190	11	5	67,65
FA3G3Lac1S3	12,37	3510,230	3510,190	11	5	68,88
FA4G4S4	12,70	3801,355	3801,286	18	11	71,77
FA4G4Lac1S3	13,20	3875,413	3875,322	23	5	74,50
FA4G4Lac1S4	13,77	4166,466	4166,418	12	8	77,83
FA4G4Lac4S1	15,12	4411,507	4411,600	-21	4	82,97

n/d = estructuras que no pudieron ser detectadas mediante espectrometría de masas. La estructura propuesta fue asignada en función de su valor de UG.

[#]Error (ppm): se calculó como el producto de 10^6 y el cociente correspondiente a la diferencia entre el valor m/z observado y el teórico dividido por el valor m/z teórico

*Abundancia (%): indica la proporción de la estructura descrita respecto de la totalidad de las estructuras analizadas. Se calculó teniendo en cuenta el área de los picos del cromatograma HILIC-UPLC.

Posteriormente, se llevó a cabo la digestión de los N-glicanos con exoglicosidasas (indicadas en M&M) y su posterior análisis mediante HILIC-HPLC. El cálculo de UG para cada pico fue importante no sólo para la confirmación de estructuras anteriormente asignadas mediante espectrometría de masas, sino también para la asignación de estructuras a aquellos picos para los cuales no se pudo obtener un valor de m/z. En la Fig. 40 se observa el resultado de HILIC-HPLC para la muestra pre y posdigestión con enzimas exoglicosidasas.

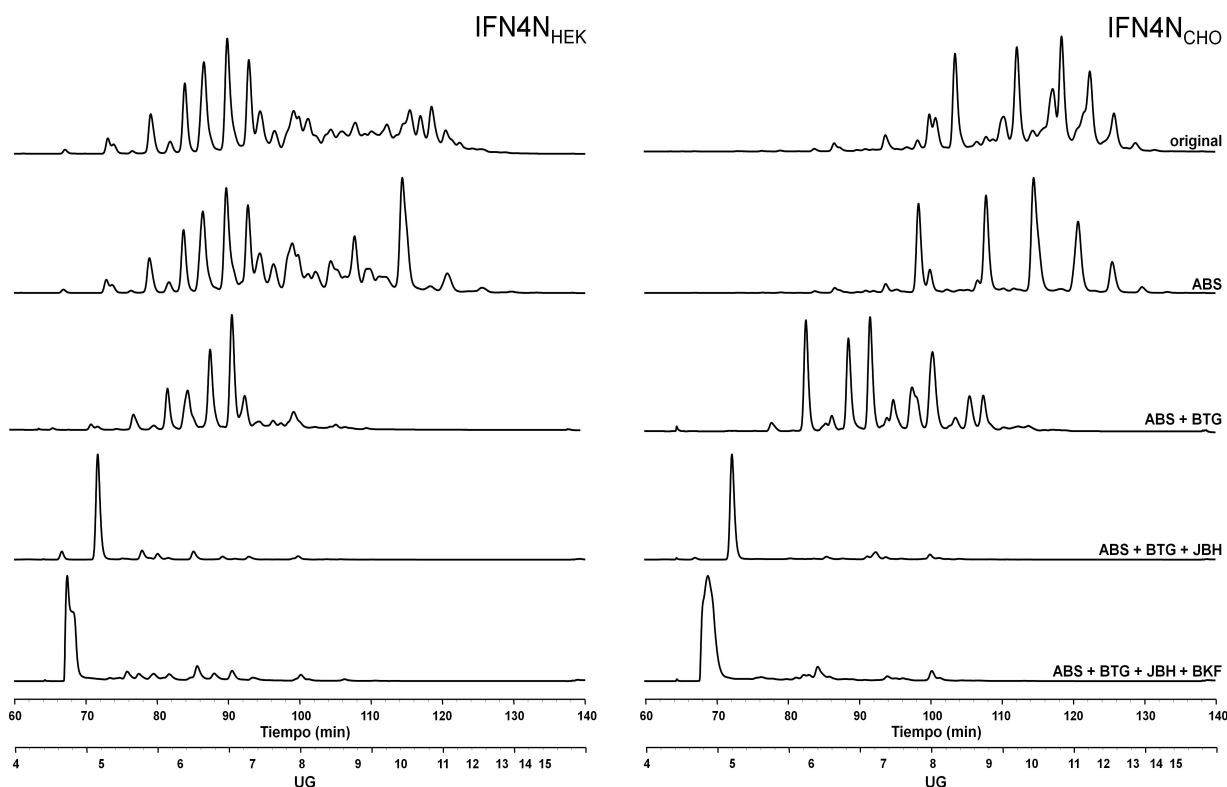


Fig. 40. Análisis de N-glicanos derivados de IFN4N_{HEK} (izq.) e IFN4N_{CHO} (der.) mediante HILIC-HPLC luego de la digestión secuencial con enzimas exoglicosidasas

Los N-glicanos obtenidos a partir del IFN4N derivado de células CHO y HEK fueron marcados con el fluoróforo 2-AB, digeridos con enzimas exoglicosidasas y luego sometidos a HILIC-HPLC. Se muestran los cromatogramas de los N-glicanos sin digerir y sometidos a diferentes procesos de digestión secuencial con las siguientes enzimas para las cuales se indica entre paréntesis sus siglas en inglés: (1) con *Arthrobacter ureafaciens* sialidasa (ABS), (2) con ABS y β -galactosidasa de testículos bovinos (BTG), (3) con ABS, BTG y β -N-acetilhexosaminidasa de poroto de soja (JBH) y, por último, (4) con ABS, BTG, JBH y α -L-fucosidasa de riñón bovino (BKF).

En términos generales, se observó que para el IFN4N_{HEK} los picos de mayor tamaño eluyeron a valores de UG entre 5 y 8 mientras que para el IFN4N_{CHO} las principales estructuras detectadas eluyeron a valores de UG entre 8 y 14. Este resultado reveló que el IFN4N_{CHO} presenta una mayor cantidad de estructuras altamente ramificadas mientras que el IFN4N_{HEK} se compone mayoritariamente de estructuras glicosídicas más pequeñas. Es importante tener en cuenta que para la variante derivada de células HEK se observaron

picos a UG mayores, demostrando también la presencia de estructuras glicosídicas altamente ramificadas pero en menores cantidades.

El análisis de N-glicanos del IFN4N_{CHO} mediante espectrometría de masas permitió identificar estructuras completas principalmente constituidas por glicanos bi-, tri- y tetraantenarios con extensiones LacNAc. Las abundancias relativas calculadas para cada pico evidenciaron que las estructuras FA2G2S2, FA3G3S3, FA4G4S4 y FA4G4Lac1S4 fueron las más abundantes (Fig. 39, Tabla VIII). En este caso, la digestión con exoglicosidasas y análisis mediante HILIC-HPLC fue empleada como herramienta complementaria y a su vez permitió afirmar que todas las estructuras glicosídicas tipo N derivadas del IFN4N producido en células CHO se encontraban completamente fucosiladas.

La evaluación de los N-glicanos derivados de IFN4N_{HEK} demostró predominancia de estructuras glicosídicas incompletas o truncas. Si bien algunas estructuras no pudieron ser identificadas mediante espectrometría de masas, la asignación de UG y el análisis mediante digestión con exoglicosidasas permitió realizar la asignación de estructuras. Las estructuras más abundantes fueron FA2B/FA3, FA2G1 y FA2BG1. La presencia de estructuras conteniendo GlcNAc bisectante fue observada para la muestra derivada de células humanas mientras que no se observó en la muestra proveniente de células CHO. A su vez, la digestión con exoglicosidasas evidenció que un 4,5% de las estructuras N-glicosídicas no se encontraban fucosiladas.

Para el análisis de las estructuras glicosídicas en base a las UG calculadas se tuvo en cuenta lo reportado en la GlycoBase (*National Institute for Bioprocessing Research and Training*, Dublin, Irlanda). Además las estructuras asignadas para los glicanos derivados del IFN4N_{CHO} coincidieron con lo reportado por la bibliografía en términos de UG (Guile y col., 1996; Butler y col., 2003; Royle y col., 2008; Shahrokh y col., 2010).

Los resultados obtenidos demuestran una elevada correlación con lo observado en la bibliografía consultada. Específicamente, la producción de agentes estimuladores de la eritropoyesis (ESAs) mediante el empleo de células CHO permitió obtener una variante que contiene glicanos con extensiones LacNAc. Sin embargo, muy pequeñas cantidades de la estructura glicosídica mencionada, también conocida como *repeat*, fueron detectadas para los ESAs derivados de células humanas, tal es el caso de la DYNEPOTM (Shahrokh y col., 2010). Además, se ha observado que los glicanos aislados a partir del inhibidor de la proteasa- α -1-antitripsina (A1AT) producida en células HEK consisten principalmente en estructuras biantenarias mientras que no se detectó la presencia de estructuras tetraantenarias (Rosenlocher y col., 2016). A su vez, Böhm y col. reportaron la ausencia de estructuras tri- y tetraantenarias en glicanos aislados a partir de FVII recombinante (rFVII) producido en células HEK (Bohm y col., 2015).

1.8.3. Caracterización biológica *in vitro* del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK}

Las variantes IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} fueron evaluadas en relación a su capacidad *in vitro* para ejercer efectos antivirales sobre la línea celular MDBK frente a la presencia del virus VSV. Por otra parte se evaluó la capacidad de estas citoquinas para ejercer su actividad antiproliferativa *in vitro* sobre la línea celular Daudi.

A partir de dichas determinaciones y de la concentración de cada una de las moléculas, se calculó la ABE, cuyos resultados se muestran en la Fig. 41.

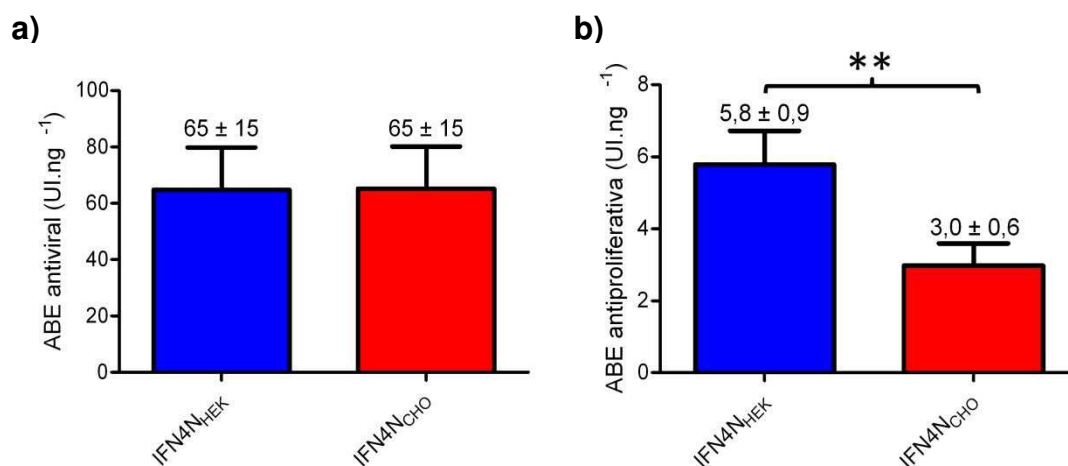


Fig. 41. Valoración de la ABE antiviral (a) y antiproliferativa (b) del IFN4N_{HEK} e IFN4N_{CHO} purificados

El gráfico muestra el promedio de los resultados obtenidos en cinco ensayos independientes \pm SD. Los dos asteriscos indican la existencia de diferencias significativas para $p < 0,01$.

En primer lugar se observó que la ABE antiviral del IFN4N_{HEK} e IFN4N_{CHO} fue superior respecto de su correspondiente valor de ABE antiproliferativa, reiterando el comportamiento observado cuando la ABE fue calculada a partir de los sobrenadantes de cultivos conteniendo IFN4N producido por los distintos clones celulares. Este comportamiento podría ser explicado teniendo en cuenta que la actividad antiproliferativa requiere de una interacción ligando-receptor más fuerte mientras que el estado antiviral puede ser inducido con una fuerza de interacción menor (Ghislain y col., 1995). En segundo lugar, si bien no se encontraron diferencias en la ABE antiviral de ambas moléculas, el IFN4N_{HEK} exhibió una ABE antiproliferativa significativamente superior respecto del IFN4N_{CHO} (** $p=0,001$). El mayor grado de glicosilación exhibido por la molécula derivada de células CHO podría ser el principal responsable de su significativamente inferior valor de ABE antiproliferativa, más aun teniendo en cuenta que este tipo de actividad es más sensible a cambios en la afinidad de unión al receptor respecto de la actividad antiviral (Thomas y col., 2011). Particularmente, se ha demostrado que, a menor contenido de ácido siálico, mayor es la ABE *in vitro* de la proteína, siendo EPO un caso emblemático de esta

regla (Goto y col., 1988). En otro trabajo, la línea celular CHO Lec2, la cual es deficiente en la generación de residuos de ácido sialico terminal debido a un defectuoso transporte de ácido siálico a través de las vesículas del Golgi por medio del nucleótido CMP, se utilizó para producir la hormona h-TSH en forma más activa que la proveniente de células CHOwt. Además, se observó que luego de la digestión con neuraminidasa, la hTSH_{CHO} incrementó su actividad *in vitro* a un valor de EC50 similar al obtenido para la proteína producida en CHO Lec2. Seguidamente, se evaluó la hTSH producida empleando células HEK como huésped, la cual exhibió una actividad *in vitro* seis veces superior respecto de la hTSH_{CHO} (Grossmann y col., 1995).

La capacidad antiproliferativa del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} también fue evaluada en líneas celulares derivadas de tumores sólidos: células ACHN (derivadas de carcinoma renal), células A375 (obtenidas a partir de melanoma maligno) y células PC-3 (aisladas de cáncer de próstata), con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos a partir de células Daudi. La sensibilidad de estas líneas celulares frente a la citoquina estudiada fue menor, motivo por el cual se requirió una cantidad mucho mayor de proteína para poder evidenciar el efecto buscado. De este modo, para estos ensayos se llevó a cabo el cálculo de la concentración de IFN4N necesaria para lograr una inhibición del crecimiento a un 50% (IC50).

En la tabla IX se observan los valores de IC50 para el IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} ensayados sobre las tres líneas celulares mencionadas. En general, se observó que la línea celular más sensible al tratamiento con IFN fue PC-3, seguida de A375 y ACHN. Las dos moléculas fueron capaces de inhibir la proliferación de las líneas celulares, sin embargo, la molécula producida en células HEK fue más eficiente que la variante producida en células CHO. Para todas las líneas celulares evaluadas se requirió una mayor concentración de IFN4N_{CHO} para alcanzar el mismo efecto logrado por el IFN4N_{HEK}. Particularmente, para ACHN el efecto de ambas proteínas fue notablemente diferente (relación de IC50IFN4N_{CHO}/IC50IFN4N_{HEK} = 2,5)

Tabla IX. Efecto del IFN4N_{HEK} e IFN4N_{CHO} sobre las líneas celulares ACHN, A375 y PC-3 medido mediante evaluación del parámetro IC50

Línea celular	IC50 IFN4N _{CHO} ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)			IC50 IFN4N _{HEK} ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)			Relación IC50IFN4N _{CHO} / IC50IFN4N _{HEK} *
ACHN	2,6	±	0,8	1,03	±	0,04	2,5
A375	1,3	±	0,4	0,99	±	0,16	1,3
PC-3	0,99	±	0,13	0,65	±	0,01	1,5

*La relación permite determinar cuántas veces más de IFN4N_{CHO} se necesita para alcanzar el efecto logrado por el IFN4N_{HEK}.

Los resultados de estos ensayos permitieron confirmar la mayor capacidad del IFN4N_{HEK} para inhibir el crecimiento de las líneas celulares, comparativamente con el IFN4N_{CHO}. Una vez más, la variante con menor grado de sialidación exhibió mayor afinidad de unión al receptor celular, lo cual se tradujo en una señal de transducción más fuerte y, en consecuencia, en una mayor actividad antiproliferativa.

1.8.4. Evaluación de la estabilidad del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} a elevadas temperaturas

Inicialmente se evaluó la estabilidad del IFN4N derivado de células CHO y células HEK a elevadas temperaturas. Se ha descrito que la glicosilación permite mejorar la estabilidad térmica y cinética de las proteínas. El incremento de la estabilidad térmica puede expresarse como un aumento en la temperatura de *melting* de la proteína. Diferentes estudios que evalúan la estabilidad de diversas proteínas en sus formas glicosiladas y no glicosiladas demostraron que los glicanos presentan diversos efectos sobre la cinética del plegamiento e indican una mejorada estabilidad termodinámica de las variantes en su forma glicosilada (Shental-Bechor y Levy, 2008; Manning y col., 2010).

Teniendo en cuenta las diferencias observadas en el grado de glicosilación del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK}, se estudió si dichas disparidades conducían a diferencias en su estabilidad térmica. Este experimento consistió en incubar ambas moléculas durante 10 min a diferentes temperaturas y luego determinar su AB antiviral. Se consideró la muestra sometida a 20 °C como control de la máxima AB para calcular la actividad residual del resto de las muestras. En la Fig. 42 se observa que ambas muestras conservaron el 100% de su actividad hasta los 55 °C. Sin embargo, a 65 °C la actividad biológica residual del IFN4N_{HEK} sufrió una disminución, mientras que la AB residual del IFN4N_{CHO} permaneció estable. A 75 °C, la estabilidad térmica de ambas moléculas se redujo a un 50% aproximadamente. En este caso, podríamos concluir que el mayor grado de glicosilación observado para el IFN4N_{CHO} le conferiría una mayor estabilidad térmica respecto del IFN4N_{HEK}.

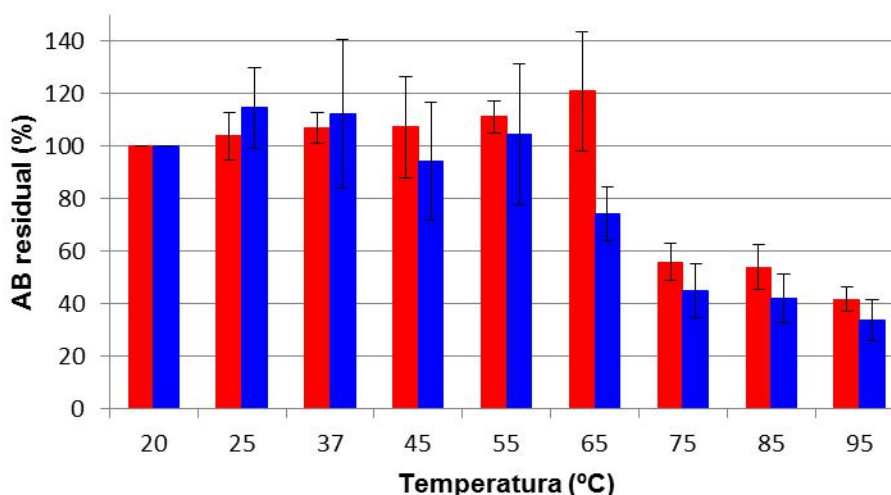


Fig. 42. Evaluación de la estabilidad térmica del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} frente a diferentes temperaturas.

Tanto el IFN4N_{HEK} (■) como el IFN4N_{CHO} (■) fueron incubados a diferentes temperaturas durante 10 min. Las muestras obtenidas fueron valoradas mediante ensayo de actividad biológica antiviral *in vitro*. El ensayo de estabilidad fue realizado en dos ocasiones y cada una de las muestras fue valorada por triplicado. Se asignó un 100% de actividad a la muestra correspondiente a la incubación a 20 °C para calcular la actividad residual del resto de las muestras, incubadas a mayores temperaturas. Para cada valor de temperatura se graficó la actividad residual \pm SD.

1.8.5. Evaluación farmacocinética del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK}

Las propiedades farmacocinéticas de las glicoproteínas son altamente influenciadas por los oligosacáridos que las conforman y resultan críticas para la determinación de su eficacia terapéutica. La farmacocinética del IFN4N_{HEK} e IFN4N_{CHO} fue llevada a cabo con el objetivo de evaluar la influencia de su perfil glicosídico sobre su velocidad de depuración o *clearance*, vida media plasmática, concentración máxima y tiempo necesario para alcanzarla.

Las diferencias observadas en el grado de glicosilación del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} no generaron grandes diferencias en sus perfiles farmacocinéticos (Fig. 43). Sólo se visualizaron diferencias significativas durante la fase de absorción. Específicamente, el $T_{\text{máx}}$ del IFN4N_{CHO} fue aproximadamente 3 veces superior respecto del correspondiente para la proteína producida en HEK, indicando que el mismo requiere de un tiempo significativamente más prolongado para alcanzar la máxima concentración plasmática ($p=0,03$). De todos modos, el $C_{\text{máx}}$ de las dos proteínas no evidenció diferencias significativas (Tabla X).

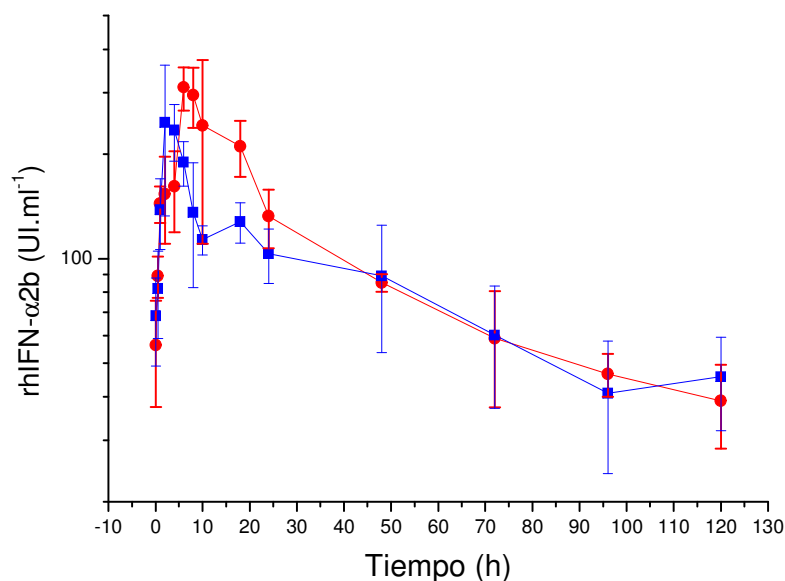


Fig. 43. Perfil farmacocinético del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} luego de inyección subcutánea en animales de experimentación

Se graficó la AB antiviral del IFN4N_{HEK} (■) e IFN4N_{CHO} (●) en función del tiempo transcurrido desde la inyección. Los resultados para cada tiempo se muestran como el promedio ± SD (n=4).

Por otra parte, no se observaron diferencias significativas entre los parámetros $t_{1/2}$, AUC y CL_{app} calculados para el IFN4N_{HEK} e IFN4N_{CHO}.

Si bien muchos autores han descripto que el incremento del grado de glicosilación contribuye a un mejoramiento de las propiedades farmacocinéticas (Sinclair y Elliott, 2005; Costa y col., 2014), el entendimiento del comportamiento farmacocinético de cada molécula parecería ser más complejo.

Estudios previos han demostrado que las proteínas conteniendo Gal como glicano terminal (glicano desialilado) son removidas rápidamente de la circulación a través de endocitosis mediada por receptores de asialoglicoproteínas expresados en hepatocitos (Morell y col., 1971). Además, se ha postulado que las glicoproteínas conteniendo Man, Fuc o GlcNAc como glicanos terminales pueden ser removidas de la circulación mediante interacciones específicas con otros receptores tipo lectina expresados en diferentes tipos de células en mamíferos. Por otra parte, es importante tener en cuenta que las glicoproteínas pueden ser dirigidas hacia cierto tipo de tejidos y órganos dependiendo de las estructuras glicosídicas que contengan (Bocci y col., 1990; Mahmood y Green, 2005; Sola y Griebenow, 2010; Higel y col., 2016). Las evidencias postuladas permitirían explicar el comportamiento farmacocinético del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK}. Las diferencias en el grado de glicosilación de ambas proteínas podrían ser las responsables de su direccionamiento hacia distintas vías de absorción y eliminación, promoviendo o interfiriendo en la interacción con los receptores partícipes de las mismas. Al involucrarse en diferentes vías farmacocinéticas no sería

sorprendente que el comportamiento de ambas moléculas presente grandes similitudes, a pesar de las diferencias glicosídicas postuladas.

Tabla X. Parámetros farmacocinéticos del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} luego de su inyección subcutánea en ratas

Muestra	C _{máx} (UI.ml ⁻¹)	T _{máx} (h)	t _{1/2} (h)	AUC (UI.h.ml ⁻¹)	CL _{app} (ml.h ⁻¹)
IFN4N _{CHO}	194 ± 17	7,2 ± 1,3	54 ± 6	11732 ± 1115	17 ± 2
IFN4N _{HEK}	149 ± 27	2,7 ± 0,3	57 ± 7	9679 ± 1206	21 ± 3

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

C_{máx}: concentración máxima

T_{máx}: tiempo necesario para alcanzar la concentración máxima

t_{1/2}: tiempo de vida media terminal

AUC: área bajo la curva de AB antiviral vs. tiempo

CL_{app}: *clearance* aparente o velocidad de eliminación

1.8.6. Análisis de la actividad biológica *in vivo* del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK}

El IFN- α es capaz de ejercer su acción antitumoral no sólo a través de la inhibición de la proliferación celular, sino también mediante la regulación negativa de la expresión de oncogenes e inducción de genes supresores de tumores (Belardelli y col., 2002). Además su efectividad demostrada en modelos tumorales ha permitido describirlo como un potente inhibidor de la angiogénesis (Indraccolo, 2010). La inhibición del desarrollo de vasos sanguíneos es un proceso que permite interferir en el desarrollo de tumores (Lindner, 2002). Específicamente, el IFN- α es capaz de ejercer su acción antiangiogénica mediante inhibición de la expresión o regulación negativa de ciertos factores que promueven la angiogénesis y, consecuentemente, la progresión de tumores. Entre ellos podemos mencionar: el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), la interleuquina 8 (IL-8), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y la metaloproteinasa de matriz-9 (MMP-9). Es importante tener en cuenta que la administración de IFN- α en ratones transgénicos modelo de adenocarcinoma de próstata durante las etapas tempranas del desarrollo del cáncer condujo a la inhibición sustancial de la angiogénesis (Persano y col., 2009; Indraccolo, 2010).

Las diferencias en el grado de glicosilación del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK}, así como también en la ABE antiproliferativa *in vitro*, estimularon el análisis y comparación de ambas citoquinas en ensayos de AB antitumoral *in vivo*. Este tipo de ensayos permite evaluar la capacidad del IFN para disminuir el crecimiento de tumores sólidos implantados subcutáneamente en ratones inmunocomprometidos.

El experimento fue realizado empleando ratones *nude* atímicos de la cepa N:NIH nu/nu a los que se implantaron células tumorales de origen humano PC-3. En la Fig. 44 se muestran las curvas que indican el volumen promedio de los tumores correspondientes al grupo de ratones tratados con IFN4N_{CHO}, IFN4N_{HEK} y control (PBS) en función del tiempo

desde el comienzo del tratamiento. Se observó claramente que ambas moléculas permitieron retardar el crecimiento de los tumores, en comparación con el control. A su vez, el IFN4N_{HEK} resultó ser el más efectivo, ya que su curva de crecimiento siempre se mantuvo por debajo de la curva correspondiente a los tumores derivados del tratamiento con IFN4N_{CHO}.

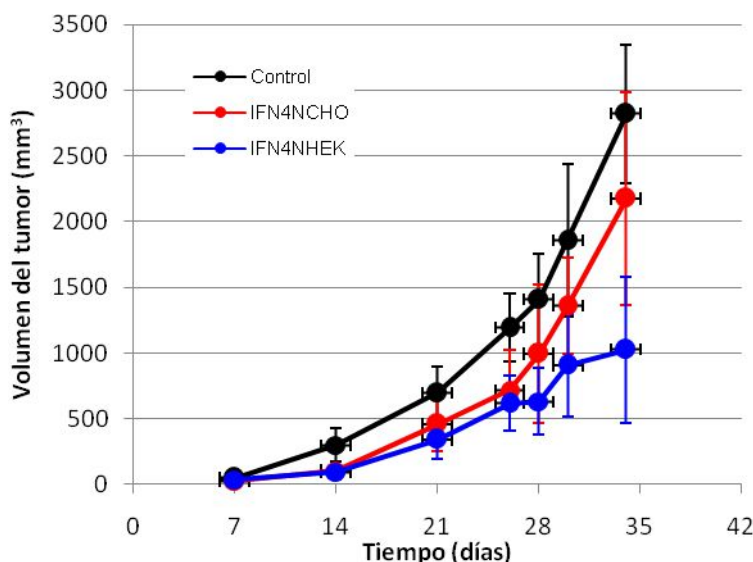


Fig. 44. Evaluación del efecto antitumoral *in vivo* del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} sobre el crecimiento de tumores de células PC-3 implantadas subcutáneamente en ratones *nude*.

La generación del modelo tumoral se realizó mediante la inyección subcutánea de $2 \cdot 10^6$ células de la línea tumoral prostática PC-3. Dos días después, se comenzó el tratamiento que consistió en la inyección semanal de $5 \mu\text{g}$ de IFN4N_{CHO} (●) o IFN4N_{HEK} (●). El grupo control (●) fue sometido a inyección con PBS, que constituye el excipiente de las moléculas anteriormente mencionadas. En el eje de ordenadas se graficó el volumen promedio del tumor (determinado por medición de las dimensiones del tumor con un calibre, asumiendo una geometría elipsoidal) en función del tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento, en el eje de abscisas. Los resultados se expresaron como el valor promedio \pm SD ($n=6$).

Posteriormente, a partir de la Fig. 44 se calcularon las velocidades de crecimiento de los tumores para cada uno de los tratamientos. Específicamente, en las muestras control e IFN4N_{CHO} se identificaron dos fases de crecimiento: una fase inicial lenta y una fase final más rápida. La primera se extendió desde el inicio del tratamiento hasta el día 26, mientras que la segunda etapa comprendió los días 26 a 34. Las velocidades de crecimiento calculadas para el grupo control fueron $42 \pm 11 \text{ mm}^3 \cdot \text{día}^{-1}$ y $147 \pm 32 \text{ mm}^3 \cdot \text{día}^{-1}$, para la primera y segunda etapa, respectivamente. Para el IFN4N_{CHO} la velocidad de crecimiento de la primera fase fue de $15 \pm 5 \text{ mm}^3 \cdot \text{día}^{-1}$ mientras que para la segunda fase se obtuvo un valor de $78 \pm 32 \text{ mm}^3 \cdot \text{día}^{-1}$. Ambos valores demuestran la capacidad del IFN4N_{CHO} para reducir aproximadamente en un 50% la velocidad de crecimiento de los tumores. En el caso

del IFN4N_{HEK} se identificó una única fase de crecimiento lineal a partir del día 7 de iniciado el tratamiento hasta su finalización. En este caso, la velocidad de crecimiento durante todo el tratamiento fue de $22 \pm 5 \text{ mm}^3 \cdot \text{día}^{-1}$, representando una disminución del 85% y del 72% con respecto a la velocidad de crecimiento del tumor a partir del día 26 de los grupos tratados con PBS o IFN4N_{CHO}, respectivamente. Este resultado demostró la mayor eficacia de la molécula derivada de células HEK como agente antitumoral.

El último día del experimento, 34 días posteriores al comienzo del tratamiento, se realizó el sacrificio de los ratones, la extracción de los tumores y la determinación de su peso. El peso promedio de los tumores derivados del tratamiento con IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} fue significativamente inferior respecto del grupo control ($p=0,0184$ y $p=0,0009$, respectivamente; Fig. 45). Además, este resultado confirmó que el tratamiento con IFN4N derivado de células HEK fue significativamente más eficiente que el tratamiento realizado con la molécula proveniente de células CHO ($p=0,0106$). En la Fig. 46 se observa una fotografía de los tumores extraídos al finalizar este experimento. El análisis macroscópico evidencia que los tumores provenientes del tratamiento con IFN4N_{HEK} son más pequeños y presentan menor grado de vascularización respecto de los tumores control y los derivados del tratamiento con IFN4N_{CHO}.

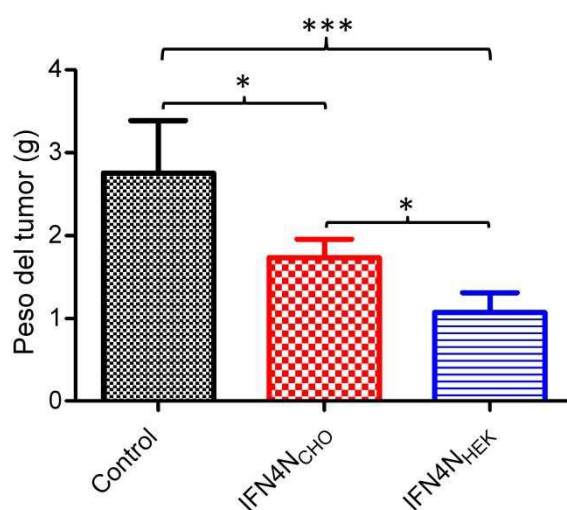


Fig. 45. Evaluación del efecto antitumoral *in vivo* del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK}. Análisis del peso de los tumores generados en ratones *nude* a partir de la implantación subcutánea de células tumorales de origen prostático de la línea PC-3

A los 34 días de inyectada la primera dosis se realizó el sacrificio de los animales, extracción de los tumores y determinación de su peso. Se muestra el peso promedio de los tumores provenientes del grupo control y de los tratamientos con IFN4N_{CHO} (●) o IFN4N_{HEK} (●). Los resultados se expresan como el valor promedio \pm SD ($n=6$).

Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas: * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$) y *** ($p<0,001$).



Fig. 46. Fotografía de los tumores extraídos de los ratones *nude* inoculados con células PC-3 y sometidos al tratamiento con IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK}
Luego de la extracción, los tumores fueron fotografiados y pesados.

Los estudios *in vivo* con ambas moléculas demostraron que la obtenida a partir de células HEK fue capaz de disminuir con mayor eficiencia la velocidad de crecimiento de los tumores generados luego de la inoculación de células neoplásicas de origen prostático a los ratones *nude*. En dicho contexto y en ausencia de diferencias significativas a nivel farmacocinético entre ambas glicoproteínas, la glicosilación desarrollada por las células humanas inclinó la balanza hacia una mejora en la actividad *in vitro* que probablemente fue responsable de una mayor potencia antitumoral *in vivo*.

2. Obtención de nuevas variantes del hIFN- α 2b con características mejoradas respecto del IFN4N

El objetivo principal de esta segunda parte de la tesis consistió en construir nuevas variantes hiperglicosiladas del hIFN- α 2b que presenten mejoras a nivel de sus propiedades farmacocinéticas y/o de interacción con el receptor con respecto al IFN4N y que, de este modo, conduzcan a un incremento de la actividad biológica evaluada *in vivo*. Las modificaciones realizadas en la secuencia del hIFN- α 2b consistieron en introducir nuevos sitios potenciales para N-glicosilación de acuerdo con la secuencia consenso N-X-T (siendo X diferente de Pro) en la molécula de IFN4N o bien, en eliminar modificaciones que se habían realizado previamente para la obtención de dicha variante hiperglicosilada y que resultaron perjudiciales para las propiedades de la proteína.

Con relación a las modificaciones efectuadas para introducir sitios potenciales de N-glicosilación en la molécula de IFN4N se seleccionó el procedimiento de generación de mutaciones puntuales y/o la introducción de un péptido de 9 aminoácidos en su extremo N-terminal. El péptido ANITVNITV se caracteriza por presentar dos sitios potenciales para N-glicosilación y fue descrito por Perlmann y col. (2003), quienes demostraron mejoras en el perfil farmacocinético de la proteína modificada.

Para lograr el objetivo antes indicado, se propuso la generación de grupos de muteínas destinados a estudiar una mejora en la actividad biológica *in vivo* del IFN4N desde los dos puntos de vista inicialmente mencionados: optimización de las propiedades farmacocinéticas y/o de la interacción con el receptor para aumentar la actividad antiproliferativa. Los grupos propuestos fueron los siguientes:

Grupo A: Muteínas con superior actividad biológica antiproliferativa *in vitro* y similar grado de glicosilación. Dado que se determinó que la mutación R23N de la molécula de IFN4N causaba gran disminución en la ABE antiproliferativa del IFN4N (Ceaglio y col. 2008), se decidió eliminar dicha modificación en el diseño de las nuevas muteínas. Además, todas las variantes de hIFN- α 2b propuestas para este grupo se diseñaron de manera de contener 4 sitios potenciales para N-glicosilación (4N). Las secuencias a mutar se seleccionaron teniendo en cuenta sitios de comprobada N-glicosilación en trabajos previos (Ceaglio y col., 2008; Gugliotta y col, 2010), por lo que fue posible proyectar que todas deberían presentar un grado de glicosilación similar. Las muteínas propuestas fueron:

IFN3NM47:	Presenta las mutaciones P4N, F47T, K70N, D77N
IFN3NM95:	Presenta las mutaciones P4N, K70N, D77N, L95T
IFN2NM47/95:	Presenta las mutaciones P4N, F47T, D77N, L95T

IFN2NMutNter: Presenta las mutaciones P4N, D77N y el péptido ANITVNITV en el extremo *N*-terminal.

Grupo B: Muteínas con superior grado de glicosilación y similar o inferior actividad biológica antiproliferativa *in vitro*. En este caso se construyeron variantes con 5 o más sitios potenciales para N-glicosilación y se conservó la mutación R23N. Las nuevas variantes propuestas fueron:

IFN4NM47: Presenta las mutaciones P4N, R23N, F47T, K70N y D77N

IFN4NM95: Presenta las mutaciones P4N, R23N, K70N, D77N y L95T

IFN4NMutNter: Presenta las mutaciones P4N, R23N, K70N, D77N y el péptido ANITVNITV en el extremo *N*-terminal.

Las muteínas IFN4NM47 e IFN4NM95 presentan 5 sitios potenciales de N-glicosilación (5N) mientras que IFN4NMutNterm presenta 6 sitios (6N).

Grupo C: Muteínas con superior grado de glicosilación y actividad biológica antiproliferativa *in vitro*. En este caso se construyeron variantes del hIFN- α 2b conteniendo 5 o más sitios potenciales para N-glicosilación. La mutación R23N no fue tomada en cuenta para el diseño de las muteínas de este grupo ya que el objetivo fue mejorar, simultáneamente, la ABE antiproliferativa *in vitro* respecto del IFN4N. Las muteínas propuestas fueron:

IFN3NM47/95: Presenta las mutaciones P4N, F47T, K70N, D77N y L95T

IFN3NMutNter: Presenta las mutaciones P4N, K70N, D77N y el péptido ANITVNITV en el extremo *N*-terminal.

IFN3NM47MutNter: Presenta las mutaciones P4N, F47T, K70N, D77N y el péptido ANITVNITV en el extremo *N*-terminal.

Las variantes IFN3NM47/95 e IFN3NMutNterm poseen 5 sitios potenciales para N-glicosilación mientras que IFN3NM47MutNterm presenta 6 sitios.

Además, se llevó a cabo el diseño de la variante IFNwtMutNter que resultó de la fusión del péptido ANITVNITV al extremo *N*-terminal de la secuencia del hIFN- α 2b. Esta variante fue construida a los fines de conocer con mayor detalle la influencia del péptido de 9 aminoácidos sobre las distintas propiedades del hIFN- α 2b.

2.1. Construcción de muteínas del hIFN- α 2b con un número variable de sitios para N-glicosilación

2.1.1. Mutagénesis sitio-dirigida del hIFN- α 2b, IFN2N, IFN3N e IFN4N

La mutagénesis sitio-dirigida mediada por PCR permite modificar y posteriormente amplificar un pequeño fragmento de ADN. De este modo, se obtiene un gran número de copias del transgén de interés para luego proceder a su estudio (Weiner y col., 1995; Cosby y Lesley, 1997).

El procedimiento de mutagénesis fue llevado a cabo empleando como molde vectores pCIneo conteniendo los genes de hIFN- α 2b o las variantes desarrolladas previamente en nuestro laboratorio mediante el trabajo de Ceaglio y col. (2008): IFN2N (que contiene las mutaciones P4N y D77N) e IFN3N (que contiene las mutaciones P4N K70N y D77N). A partir de los mencionados genes se introdujeron las mutaciones puntuales (F47T y L95T) que permitieron generar nuevos sitios para la unión de N-glicanos. Además, se llevó a cabo la adición del péptido ANITVNITV en el extremo N-terminal de ambas secuencias. De este modo se obtuvieron las variantes IFNwtMutNter, IFN2NM47/95, IFN2NMutNter, IFN3NM47, IFN3NM95, IFN3NM47/95, IFN3NMutNter, IFN3N47MutNter.

Por otra parte, se empleó el plásmido pCI-neo IFN4N (que contiene las mutaciones a nivel de los residuos 4/23/70/77) sobre el cual se realizó la introducción de una nueva mutación puntual tanto en el residuo F47 o en L95, para así obtener las secuencias IFN4NM47 e IFN4NM95. A su vez, se llevó a cabo la construcción de la variante IFN4NMutNter mediante la adición del péptido ANITNVNITV en el extremo N-terminal del IFN4N.

Todas las modificaciones mencionadas anteriormente fueron introducidas en los genes de interés mediante mutagénesis sitio-dirigida utilizando la metodología de extensión por solapamiento mediante PCR (ES-PCR), la cual consistió en dos etapas de PCR consecutivas. En la primera etapa se realizaron dos reacciones de PCR independientes en las cuales se utilizó un oligonucleótido externo y un oligonucleótido interno, en sentido directo o reverso según corresponda, para generar dos fragmentos (A y B) que contienen la modificación de interés y cuyos extremos se solapan. Los productos de la PCR 1 fueron analizados en un gel de agarosa al 1% (P/V). En la Fig. 47a se muestra un ejemplo correspondiente a la generación de las muteínas IFN3NM47 e IFN3NM95 mientras que en la Fig. 47b se observa el resultado correspondiente a la generación de muteínas con la adición del péptido en el extremo N-terminal, en este caso, del IFN3NMutNter. En ambos casos, se indica el tamaño aproximado de los fragmentos obtenidos. Para todas las muteínas se obtuvieron 2 fragmentos del tamaño esperado y en cantidades apropiadas para los pasos posteriores.

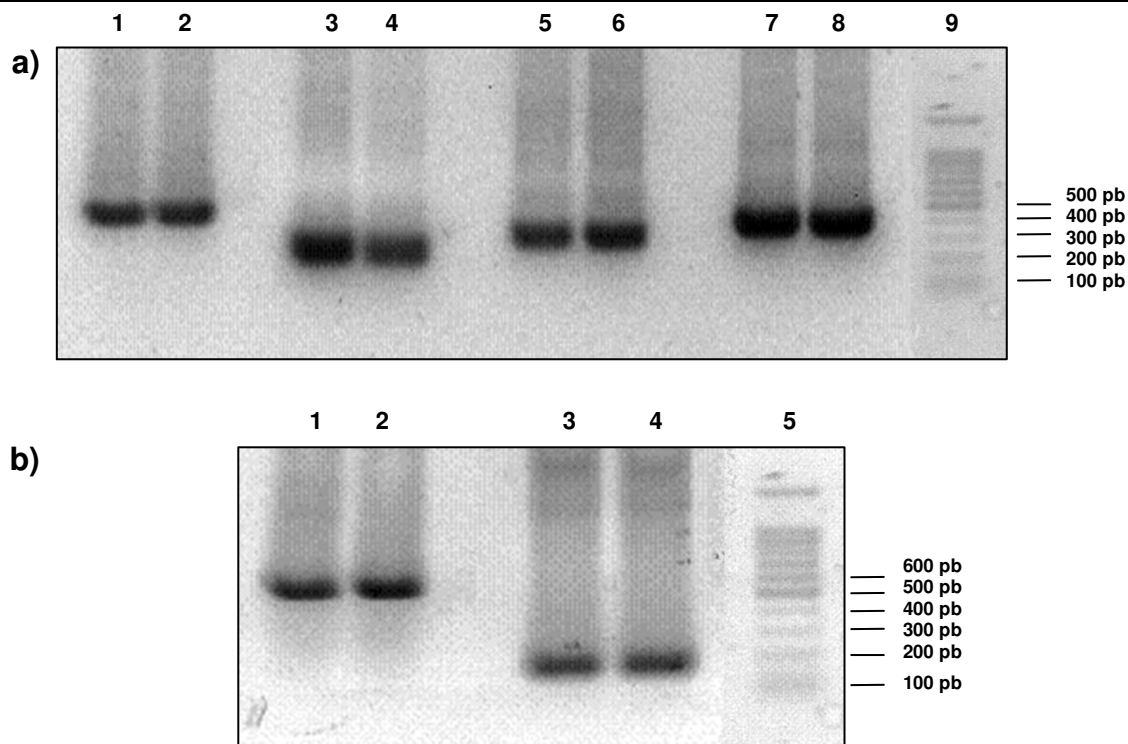


Fig. 47. Primera etapa de la ES-PCR para introducción de mutaciones puntuales en los aminoácidos 47 y 95 (a) y para la fusión del péptido ANITVNITV (b) sobre la secuencia de IFN3N

Los productos de PCR de las dos reacciones se analizaron en geles de agarosa al 1,5% (P/V). El volumen de reacción se dividió en dos fracciones y se sembró en dos calles:

(a) Muteínas IFN3NM47 e IFN3NM95.

- Calles: 1-2: Muteína IFN3NM47 (F47T) fragmento A (462 pb).
 3-4: Muteína IFN3NM47 (F47T) fragmento B (239 pb).
 5-6: Muteína IFN3NM95 (L95T) fragmento A (318 pb).
 7-8: Muteína IFN3NM95 (L95T) fragmento B (385 pb).
 9: Marcador de masa molecular (CIEN marker).

(b) Muteínas N-terminal (ANITVNITV).

- Calles: 1-2: Muteína N-terminal IFN3NMutNter fragmento A (611 pb)
 3-4: Muteína N-terminal IFN3NMutNter fragmento B (130 pb).
 5: Marcador de masa molecular (CIEN marker).

Los fragmentos se purificaron a partir del gel de agarosa y se utilizaron como molde para la segunda etapa de mutagénesis, que consistió en una única reacción de PCR para unir los dos fragmentos individuales de manera de obtener el gen completo de cada muteína. El resultado de esta etapa se muestra en la Fig. 48.

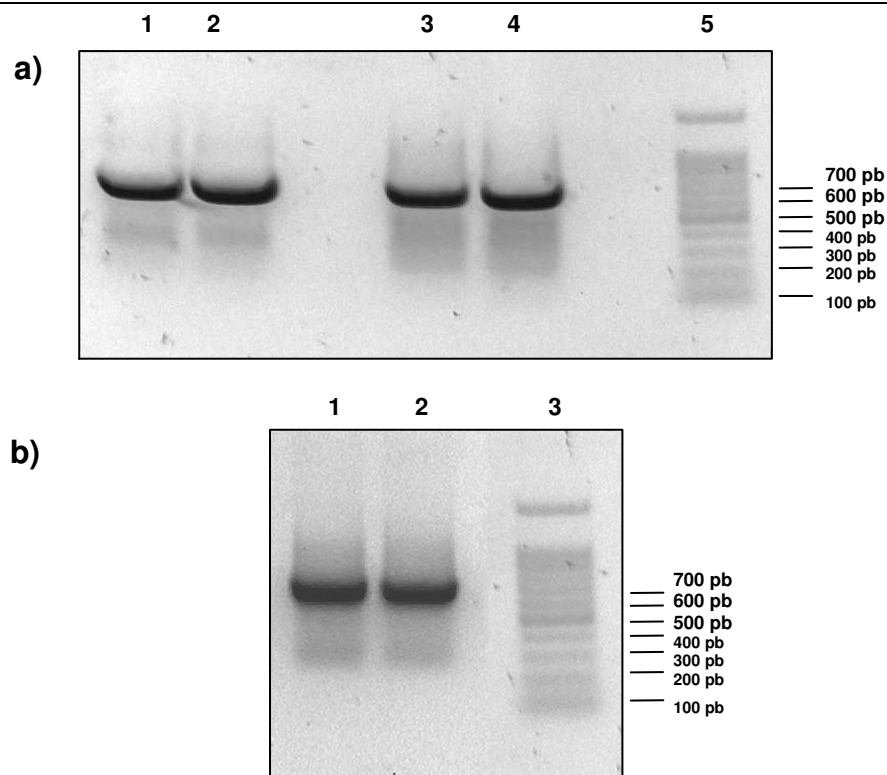


Fig. 48. Segunda etapa de la ES-PCR para la generación de muteínas derivadas del IFN3N conteniendo las mutaciones puntuales en los aminoácidos 47 y 95 (a) o el péptido ANITVNITV en su extremo N-terminal (b).

Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1,5% (P/V). El volumen de reacción se dividió en dos fracciones y se sembró en dos calles:

- (a)** Muteínas IFN3NM47 e IFN3NM95.
 Calles: 1-2: Muteína IFN3NM47 (F47T) (673 pb).
 3-4: Muteína IFN3NM95 (L95T) (673 pb).
 5: Marcador de masa molecular (CIEN marker).
- (b)** Muteínas N-terminal (ANITVNITV).
 Calles: 1-2: Muteína N-terminal IFN3NMutNter (700 pb).
 3: Marcador de masa molecular (CIEN marker).

2.1.1. Clonado de los genes de las nuevas muteínas del hIFN- α 2b en el vector de expresión pCI-neo

El clonado de las nuevas muteínas en el vector de expresión para células eucariotas pCI-neo y su posterior empleo en ensayos de transfección transitoria son etapas fundamentales a los fines de obtener cantidades moderadas de las nuevas proteínas en sobrenadantes de cultivo que permitan realizar su caracterización de forma general.

Las nuevas variantes del hIFN- α 2b fueron digeridas con las enzimas de restricción *EcoR* I y *Xba* I y purificadas a partir de la solución, con el fin de eliminar las enzimas de restricción, sales y los fragmentos de ADN residuales cortos provenientes de la digestión. Posteriormente se realizó la ligación de los fragmentos mencionados al vector de expresión para células eucariotas pCI-neo, previamente linealizado con las mismas enzimas. Luego de

la transformación bacteriana se seleccionaron clones al azar y la presencia del inserto fue confirmada mediante digestión con las mismas enzimas de restricción empleadas para el clonado (Fig. 49).

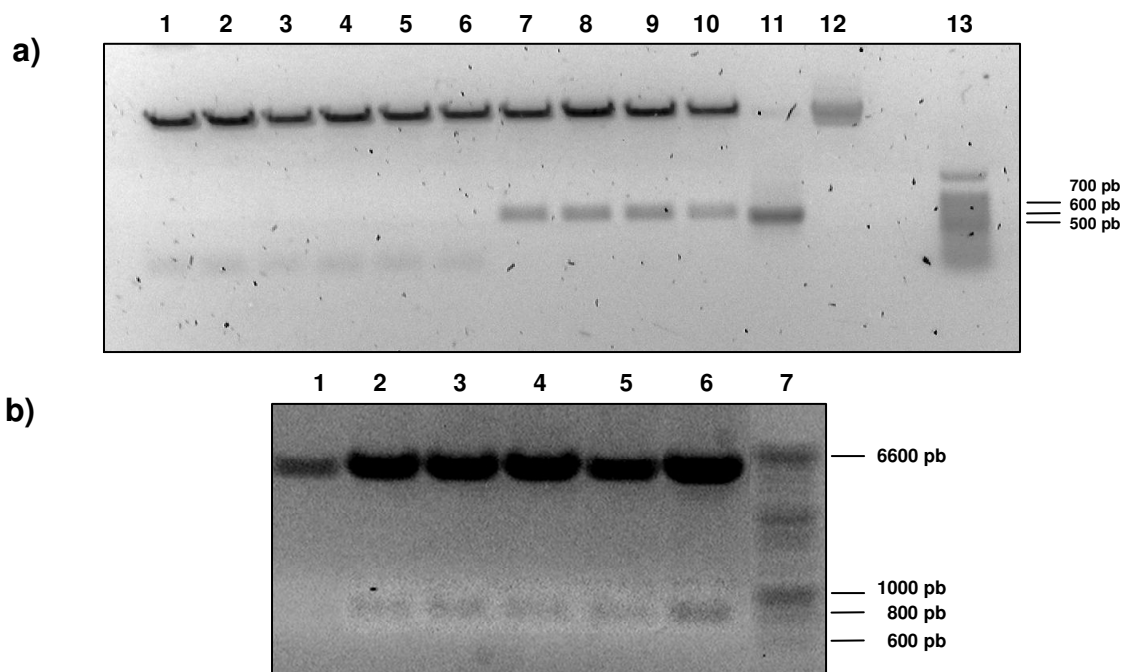


Fig.49. Clonado de las variantes IFN3NM47, IFN3NM95 e IFN3NMutNter conteniendo modificaciones F47T, L95T (a) y N-terminal (ANITVNITV) en el vector pCI-neo.

Los plásmidos pCI-neo obtenidos de colonias escogidas al azar fueron digeridos con las enzimas *EcoR* I y *Xba* I y analizados en un gel de agarosa al 1% (P/V). Se ejemplifica la obtención de variantes con mutaciones puntuales y con el péptido en el extremo N-terminal.

(a) Muteínas IFN3NM47 e IFN3NM95.

Calles: 1-10: Clones de muteínas IFN3NM47 e IFN3NM95 (673 pb).
 11: Control positivo (fragmento de PCR 2: 673 pb).
 12: Control negativo (pCI-neo)
 13: Marcador de masa molecular (C1EN marker).

(b) Muteína IFN3NMutNter.

Calles: 1-6: Clones de la Muteína N-terminal IFN3NMutNter (700 pb).
 7: Marcador de masa molecular (200 bp DNA Step Ladder).

La presencia de clones positivos para ambos tipos de muteínas se confirmó al observar la liberación de una banda de aproximadamente 700 pb. En la Fig. 49a se observan clones positivos ubicados en las calles 7-10 mientras que en la Fig. 49b los clones positivos se encuentran en las calles 2-6.

La presencia e identidad de las modificaciones introducidas se evaluó mediante secuenciación de 2 clones de cada una de las nuevas variantes, verificándose que al menos un clon disponía de la secuencia con la mutación esperada.

2.2. Transfecciones transitorias de células CHO empleando los vectores de expresión pCI-neo

Con el fin de caracterizar las nuevas muteínas hiperglicosiladas derivadas del hIFN- α 2b, se realizaron transfecciones transitorias de células CHO con los plásmidos contruidos previamente y verificados mediante secuenciación. Para cada muteína se realizaron dos ensayos de transfección transitoria, en dos cavidades de una placa de 6 pozos. El medio de cultivo empleado para uno de ellos fue el medio de crecimiento correspondiente para células CHO, que contiene 5% (V/V) de SFB. Para el segundo pozo de la transfección transitoria se empleó medio de cultivo con un porcentaje 10 veces menor de SFB. El sobrenadante de cultivo de este último pozo fue empleado en ensayos de SDS-PAGE/*wb*, dado que la presencia de un alto contenido de albúmina (característico del SFB) interfiere en la visualización de las bandas de mayor masa molecular de las variantes hiperglicosiladas de IFN.

2.3. Caracterización de las nuevas muteínas de hIFN- α 2b a partir de sobrenadantes de cultivo provenientes de las transfecciones transitorias

2.3.1. Cuantificación de las nuevas muteínas

La cuantificación de muteínas derivadas del hIFN- α 2b constituye una metodología fundamental no sólo en etapas de desarrollo de líneas y clones celulares recombinantes sino también para la comparación de características específicas de cada muteína que se calculan considerando su concentración. Los métodos inmunoquímicos como los ensayos de ELISA resultan ser la metodología de elección para la cuantificación de citoquinas presentes en muestras complejas. Todo método inmunoquímico destinado a la cuantificación de una proteína de interés requiere ser homologado mediante métodos de referencia para determinación de proteínas. Esto demanda la obtención de las mismas con un elevado grado de pureza y en alta concentración.

El ensayo de ELISA sándwich empleado para la cuantificación de las muteínas en sobrenadantes de cultivo fue desarrollado previamente en nuestro laboratorio (Ceaglio, 2008) empleando un mAb denominado CA5E6 para la captura del IFN y el anticuerpo policlonal C7 para su detección. A pesar de que el mAb demostró capacidad para reconocer a todas las muteínas contruidas, el sistema mAb CA5E6/pAb C7 presentó ciertas dificultades para cuantificar con precisión a las variantes hiperglicosiladas. Específicamente,

se observó una subvaloración de la concentración de las variantes con más de dos sitios potenciales para N-glicosilación presentes en los sobrenadantes de cultivo (Ceaglio, 2008; Gugliotta, 2010).

A pesar de la problemática planteada, el ensayo de ELISA sándwich resultó de gran utilidad para detectar muy bajas concentraciones de muteínas en las muestras y, de este modo, realizar la evaluación de productividades de líneas celulares y clones recombinantes productores de una determinada muteína. Sin embargo, el análisis comparativo entre valores de producción de clones desarrollados para diferentes variantes hiperglicosiladas del hIFN- α 2b así como también para comparar las características propias de cada molécula, requiere de la utilización de un método de cuantificación que permita obtener valores más aproximados a los reales. Por este motivo, se decidió evaluar la capacidad del ELISA de competición previamente diseñado en nuestro laboratorio para cuantificar de manera apropiada al IFN4N. Para ello, se emplearon dos tipos de muestras de IFN4N, una de ellas purificada mediante cromatografía de inmunoafinidad y la otra correspondiente a un sobrenadante de cultivo. Ambas fueron cuantificadas por ELISA sándwich y ELISA de competición. La muestra purificada había sido previamente cuantificada mediante espectrofotometría empleando una $\lambda_{280\text{nm}}$; de este modo, se dispuso de un valor de concentración determinada por un método de referencia (concentración IFN4N=1,51 mg.ml⁻¹). La cuantificación por ELISA sándwich y de competición se realizó por duplicado en 5 oportunidades diferentes (Tabla XI).

Tabla XI. Cuantificación de IFN4N purificado y presente en un sobrenadante de cultivo mediante ELISA sándwich y ELISA de competición.

Muestra de IFN4N	Concentración ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)						Relación ELISA competición / ELISA sándwich		
	ELISA sándwich		ELISA competición						
Proteína Purificada (1510 $\mu\text{g.ml}^{-1}$)	342	± 22	1724	± 131	5	± 1			
Sobrenadante de cultivo	0,23	± 0,01	1,0	± 0,1	5	± 1			

La utilidad del ELISA de competición para la cuantificación del IFN4N quedó demostrada, dado que el valor obtenido no presentó diferencias significativas con el valor calculado a partir de la medición espectrofotométrica. Además, para esta misma muestra el valor de concentración obtenido mediante el ensayo de competición fue 5 veces mayor con respecto al calculado mediante ELISA sándwich. Dicha relación fue similar a la determinada para la muestra correspondiente al sobrenadante de cultivo. De este modo, el ensayo de ELISA de competición fue considerado como el más apropiado para la cuantificación de muteínas hiperglicosiladas del hIFN- α 2b a partir de sobrenadantes de cultivo.

Las nuevas muteínas diseñadas y obtenidas mediante ensayos de transfección transitoria fueron inicialmente cuantificadas mediante ELISA sándwich y posteriormente evaluadas mediante ELISA de competición. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla XII. Claramente se observó que la concomitante introducción de modificaciones en la secuencia del hIFN- α 2b afectó directamente su cuantificación mediante ELISA sándwich. Los resultados obtenidos demostraron coherencia con el estudio de cuantificación realizado a partir de una muestra purificada y de sobrenadante de cultivo conteniendo IFN4N, motivo por el cual se decidió utilizar el valor de cuantificación determinado mediante ELISA de competición como el más aproximado para realizar los cálculos de ABE de cada muteína presente en un medio complejo como el sobrenadante de cultivo de células.

Tabla XII. Cuantificación mediante ELISA sándwich y ELISA de competición de las nuevas muteínas del hIFN- α 2b presentes en sobrenadantes de cultivo provenientes de transfecciones transitorias

Muteína	Concentración (ng/ml)						Relación (EC/ES)
	ELISA sándwich ^{*1}			ELISA de competición ^{*2}			
IFN <i>wild type</i>	199	±	40	297	±	65	1,5 ± 0,4
IFNwtMutNter	181	±	21	326	±	102	1,8 ± 0,6
IFN2NM47	157	±	21	460	±	59	2,9 ± 0,5
IFN4N	225	±	10	1023	±	126	4,5 ± 0,6
IFN2NM47/95	250	±	58	837	±	168	3,3 ± 1,0
IFN3NM47	129	±	17	347	±	52	2,7 ± 0,5
IFN3NM95	94	±	24	227	±	14	2,4 ± 0,6
IFN2NMutNter	139	±	24	559	±	61	4,0 ± 0,8
IFN4NM47	176	±	38	657	±	172	3,7 ± 1,3
IFN4NM95	127	±	8	418	±	100	3,3 ± 0,8
IFN3NM47/95	111	±	35	388	±	123	3,5 ± 1,6
IFN3NMutNter	190	±	50	610	±	146	3,2 ± 1,1
IFN4NMutNter	194	±	32	693	±	237	3,6 ± 1,4
IFN3NM47MutNter	107	±	29	436	±	141	4,0 ± 1,7

*1 Los resultados corresponden al valor promedio \pm SD de 5 repeticiones

*2 Los resultados corresponden al valor promedio \pm SD de 3 repeticiones

2.3.2. Evaluación del grado de glicosilación de las nuevas muteínas mediante SDS-PAGE e isoelectroenfoque seguidos de *western blot*

El ensayo de SDS-PAGE/*wb* se realizó a los fines de evaluar la masa molecular aparente de las nuevas muteínas y comparar su perfil con el correspondiente al del IFN4N y del IFNwt (Fig. 50).

La Fig. 50a evidencia el resultado correspondiente a las muteínas del grupo A, es decir, variantes con similar grado de glicosilación respecto del IFN4N. Se puede observar

que todas las variantes presentan un perfil electroforético similar al IFN4N y superior a la variante IFN2NM47 (3N).

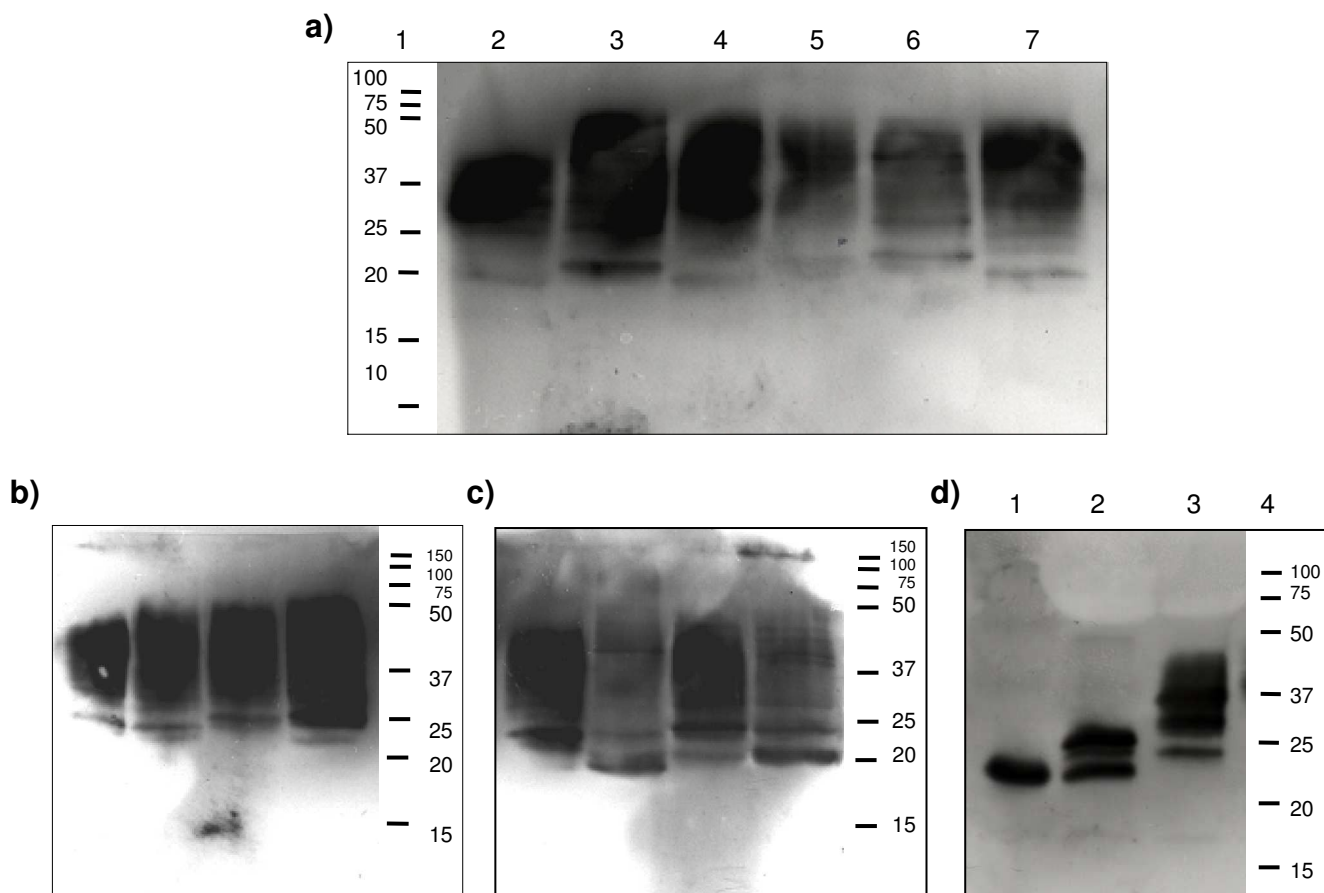


Fig. 50. Evaluación del grado de glicosilación de las nuevas muteínas del hIFN-α2b

Se sembraron sobrenadantes de cultivo provenientes de las transfecciones transitorias realizadas para las muteínas de los grupos A (a), B (b) y C (c). El western blot (d) corresponde al agregado del péptido ANITVNITV al extremo N-ter del hIFN-α2b.

- a) Marcador de masa molecular (1), IFN2NM47 (2), IFN2NM47/95 (3), IFN3NM47 (4), IFN3NM95 (5), IFN2NMutNterm (6), IFN4N (7).
- b) IFN4N (1), IFN4NM47 (2), IFN4NM95 (3), IFN4NMutNter (4), Marcador de masa molecular (5).
- c) IFN4N (1), IFN3NM47/95 (2), IFN3NMutNter (3), IFN3NM47MutNter (4), Marcador de masa molecular (5).
- d) hIFN-α2b no glicosilado (1), hIFN-α2b *wild type* (2), IFNwtMutNter (3), Marcador de masa molecular (4).

La Fig. 50b muestra los resultados para las variantes del grupo B, observándose un superior grado de glicosilación para las nuevas muteínas, de acuerdo con lo esperado. Además se observó que el IFN4NMutNter (calle 4) demostró una masa molecular aparente levemente superior a las variantes con 5 sitios potenciales de N-glicosilación (IFN4NM47 e IFN4NM95). Este resultado estaría evidenciando la posible glicosilación de ambos sitios

potenciales de N-glicosilación en el péptido ANITVNITV fusionado al extremo N-terminal de la secuencia del IFN4N.

Por otra parte, en la Fig. 50c se observa el resultado para las muteínas del grupo C, que presentan una masa molecular aparente más elevada en comparación con el IFN4N.

Finalmente, la Fig. 50d muestra el resultado de la adición del péptido ANITVNITV en el extremo N-terminal del hIFN- α 2b. Esta nueva variante evidenció un marcado incremento de su masa molecular aparente, mayor a 10kDa, como se esperaba en los análisis *in silico*.

2.3.3. Determinación de la AB *in vitro* de las nuevas muteínas a partir de muestras del ensayo de transfección transitoria

La evaluación de la AB de las nuevas variantes del hIFN- α 2b se realizó mediante ensayos *in vitro* que emplean líneas celulares. Por un lado, se evaluó la capacidad de las nuevas muteínas de reducir la velocidad de crecimiento de la línea celular Daudi. Por otro lado, la valoración de la actividad antiviral consistió en determinar la capacidad de las diferentes variantes del hIFN- α 2b de proteger a la línea celular MDBK de la infección con el virus VSV. En ambos casos, las muestras fueron cuantificadas empleando una curva de calibrado construida a partir del estándar internacional de hIFN- α 2b producido en *E. coli* (NIBSC, *National Institute for Biological Standards and Control 95/566*, OMS). A partir de los datos de AB y de los valores de concentración calculados mediante ELISA de competición, se determinó la ABE de cada variante. Los resultados se muestran en la tabla XIII.

Tabla XIII. Determinación de la ABE antiviral y antiproliferativa *in vitro* de las nuevas variantes hiperglicosiladas del hIFN- α 2b a partir de sobrenadantes de cultivo obtenidos mediante transfección transitoria

Muteína	ABE (UI.ng ⁻¹)					
	Antiviral			Antiproliferativa		
IFN <i>wild type</i>	253	±	73	205	±	96
IFNwtMutNter	143	±	56	123	±	69
IFN2NM47	206	±	50	65	±	23
IFN4N	102	±	38	13	±	7
IFN2NM47/95	101	±	25	47	±	15
IFN3NM47	112	±	39	54	±	13
IFN3NM95	101	±	31	45	±	22
IFN2NMutNter	85	±	27	44	±	10
IFN4NM47	114	±	38	12	±	5
IFN4NM95	104	±	43	8	±	4
IFN3NM47/95	87	±	31	38	±	18
IFN3NMutNter	74	±	36	41	±	16
IFN4NMutNter	95	±	54	7	±	3
IFN3NM47MutNter	68	±	28	24	±	12

variantes conteniendo la modificación L95T presentaron menor ABE antiproliferativa respecto de sus pares que no poseen dicha mutación. Tal es el caso de los pares IFN3NM47 e IFN3NM95 como así también IFN4NM47 e IFN4NM95, en los cuales la muteína que contiene L95T presentó una ABE antiproliferativa entre 1,2 y 1,5 veces inferior (Fig. 51b).

Los resultados obtenidos permitieron seleccionar a las dos mejores variantes de cada uno de los grupos propuestos inicialmente para continuar con su caracterización.

2.4. Generación de líneas celulares productoras de IFN3NM47, IFN2NM47/95, IFN4NM47, IFN4NMutNter, IFN3NM47/95 e IFN3N47MutNter mediante el empleo de la tecnología de vectores lentivirales de tercera generación

2.4.1. Obtención de plásmidos apropiados para el ensamblaje de partículas lentivirales conteniendo las secuencias de interés

La generación de líneas celulares mediante la tecnología de transferencia de genes mediada por vectores lentivirales de tercera generación requirió inicialmente del clonado de las secuencias del IFN3NM47, IFN2NM47/95, IFN4NM47, IFN4NMutNter, IFN3NM47/95 e IFN3N47MutNter en el vector de transferencia del sistema, pLV-PLK. En la Fig. 52 se muestra a modo de ejemplo el resultado de la PCR en colonia obtenido para los clones transformados con el plásmido pLV-PLK IFN3N47MutNter. En este caso, los clones 2, 5, 6 y 9 resultaron positivos. Posteriormente, se realizaron minipreparaciones de ADN de 3 de los clones mencionados (2, 5 y 6), las cuales fueron sometidas a digestión con la enzima *EcoRI* para verificar la presencia del fragmento de interés en el vector pLV-PLK. Los clones positivos evidenciaron la liberación de una banda de aproximadamente 1200 pb (Fig. 53). Por último los vectores fueron verificados mediante secuenciación.

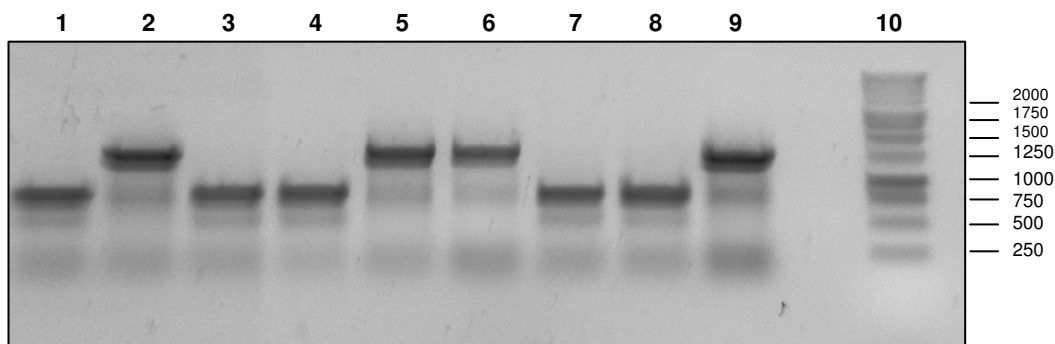


Fig. 52. Electroforesis en gel de agarosa de las muestras correspondientes al ensayo de PCR en colonia realizado para los clones pLV-PLK IFN3N47MutNter

La amplificación de un fragmento de aproximadamente 1400 pb confirmó la presencia de la secuencia de interés en el vector pLV-PLK.

Calles: 1-9: Clones pLV-PLK IFN3N47MutNter

10: Marcadores de masa molecular (Bench TOP 1kb DNA ladder)

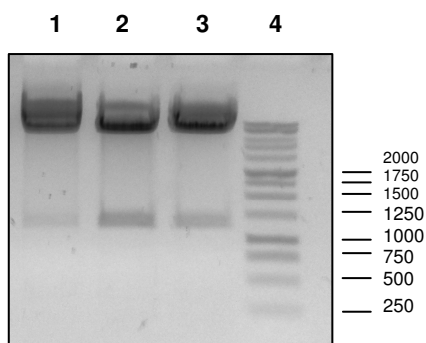


Fig. 53. Electroforesis en gel de agarosa del ADN plasmídico de los clones 2, 5 y 6 de pLV-PLK IFN3N47MutNter digerido con la enzima de restricción *EcoRI*

La liberación de un fragmento de aproximadamente 1200 pb confirmó la presencia de la secuencia de interés en el vector pLV-PLK.

Calles: 1: pLV-PLK IFN3N47MutNter clon 2

2: pLV-PLK IFN3N47MutNter clon 5

3: pLV-PLK IFN3N47MutNter clon 6

4: Marcadores de masa molecular (Bench TOP 1kb DNA ladder)

2.4.2. Ensamblado de partículas lentivirales y transducción de células CHO.

Caracterización de las líneas celulares resultantes

Si bien existen diversas metodologías que permiten llevar a cabo la generación de líneas celulares recombinantes, los antecedentes alcanzados durante los primeros experimentos de esta tesis demostraron las ventajas del empleo de partículas lentivirales para la transferencia de genes en células eucariotas.

Las seis líneas celulares resultantes fueron presionadas con concentraciones crecientes de puomicina, hasta alcanzar $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ del agente de selección. A concentraciones superiores se observó la muerte total del cultivo. Las líneas celulares resistentes a $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ fueron sometidas a un procedimiento de retransducción (200 re-Td) para incrementar aún más su producción específica. Para el caso de las líneas CHO Td

IFN3NM47/95 (200) y CHO Td IFN3N47MutNter (200) el proceso de retransducción no produjo un incremento en su producción específica (Fig. 54). Además, al incrementar la concentración de puromicina a $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ se observó muerte total de ambos cultivos. Por este motivo, para estas dos líneas celulares se decidió clonar aquéllas presionadas con $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, es decir, sin retransducir. Para el caso de las líneas celulares CHO productoras de IFN2NM47/95, IFN3NM47, IFN4NM47 e IFN4NMutNter, luego de la retransducción se observó un leve incremento en su productividad, el cual se acentuó marcadamente luego de la selección con $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ puromicina. Es importante aclarar que a mayores concentraciones del agente de selección se observó muerte total del cultivo. Las producciones específicas de todas las líneas celulares presionadas con diferentes concentraciones de puromicina y retransducidas fueron calculadas mediante ELISA sándwich (Fig. 54).

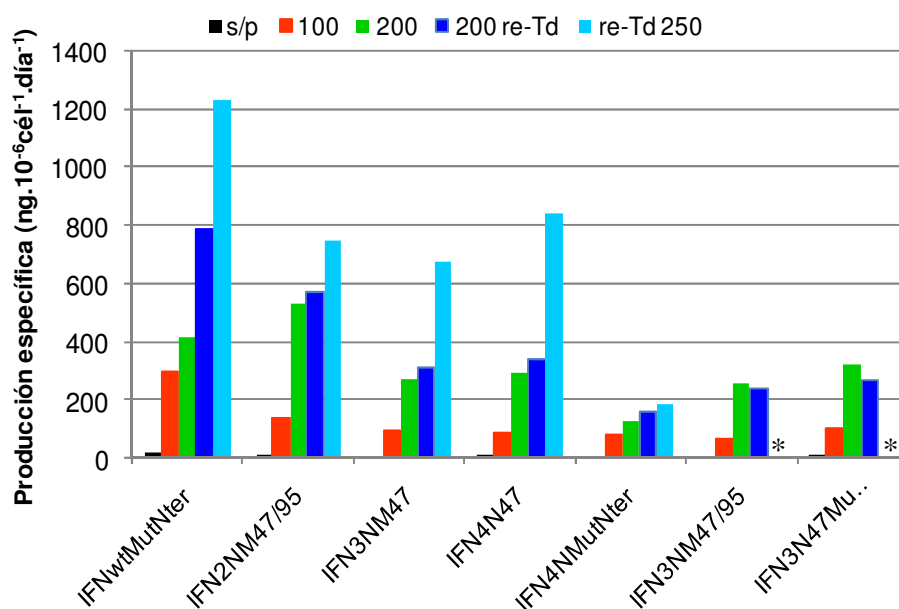


Fig. 54. Producción específica de las líneas celulares CHO productoras de IFN2NM47/95, IFN3NM47, IFN4NM47, IFN4NMutNter, IFN3NM47/95 e IFN3N47MutNter

Las líneas celulares fueron generadas mediante transducción con LVs específicos. Posteriormente fueron sometidas a presión selectiva con 100 y $200 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de puromicina. La línea celular obtenida luego de la selección con la máxima concentración de antibiótico mencionada fue retransducida (re-Td) y presionada con $250 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ del agente de selección. La producción específica de todas las líneas celulares resultantes, así como también la obtenida inicialmente, sin presionar (s/p) fue determinada mediante ELISA sándwich.

Las líneas celulares elegidas por presentar la mayor producción específica de las muteínas fueron posteriormente caracterizadas en función de la masa molecular aparente y ABE de la variante del hIFN- α 2b.

Con el objetivo de evaluar la masa molecular aparente se realizó un ensayo de SDS-PAGE/*wb*. Se emplearon sobrenadantes obtenidos a partir del cultivo en medio libre de proteínas para evitar la interferencia de la albúmina sérica bovina presente en los medios de cultivos de producción habituales que contenían SFB. Los resultados se muestran en la Fig. 55 y confirman lo observado anteriormente a partir de sobrenadantes de cultivo provenientes de las transfecciones transitorias. Es decir, a medida que se incrementó el número de sitios potenciales para N-glicosilación, también aumentó la masa molecular aparente de las muteínas.

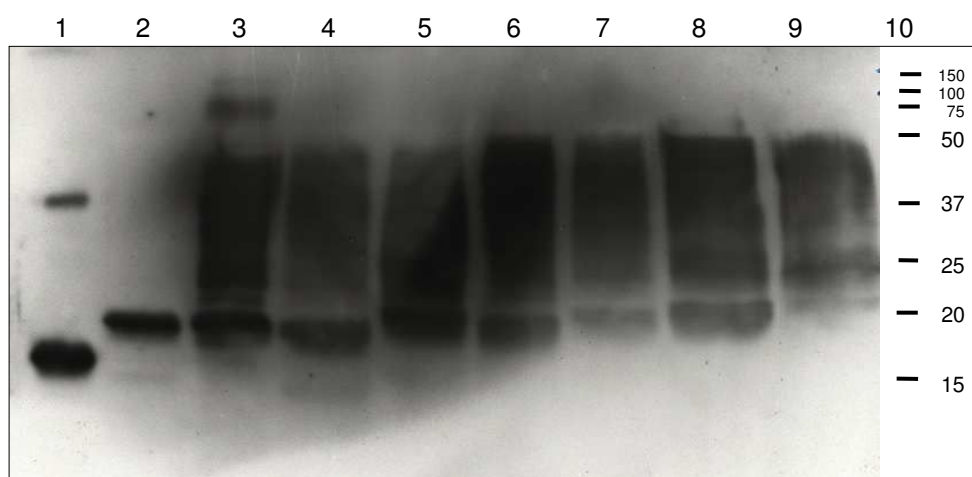


Fig. 55. Evaluación del grado de glicosilación de diferentes muteínas del hIFN- α 2b

Las diferentes muteínas sembradas y los controles correspondientes se indican a continuación:

- 1- IFN- α 2b no glicosilado
- 2- IFN *wild type*
- 3- IFN4N
- 4- IFN3NM47
- 5- IFN2NM47/95
- 6- IFN4NM47
- 7- IFN3NM47/95
- 8- IFN3N47MutNter
- 9- IFN4NMutNter
- 10- Marcador de masa molecular

Además, se evaluó la ABE antiviral y antiproliferativa *in vitro* de las muteínas obtenidas a partir de las nuevas líneas celulares. En general se observó que los valores obtenidos se encuentran dentro del rango determinado por el promedio \pm SD de los datos obtenidos para los sobrenadantes de cultivo provenientes de las transfecciones transitorias (Tabla XIV).

Tabla XIV. Determinación de la ABE antiviral y antiproliferativa *in vitro* del IFN2NM47/95, IFN3NM47, IFN4NM47, IFN4NMutNter, IFN3NM47/95 e IFN3N47MutNter a partir de sobrenadantes de cultivo de las líneas celulares CHO obtenidas mediante transducción

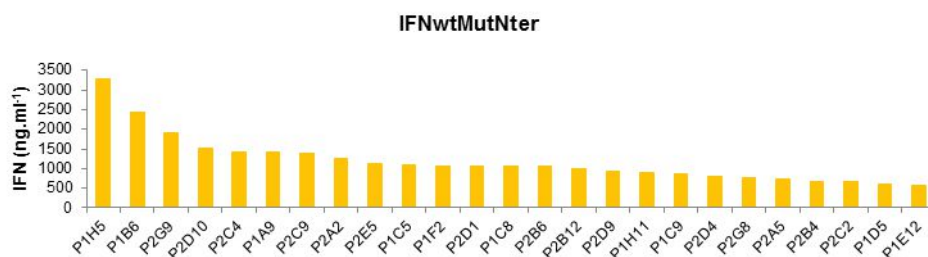
Muestra	ABE (UI.ng ⁻¹)					
	Antiviral			Antiproliferativa		
IFNwtMutNter	121	±	31	60	±	26
IFN2NM47/95	80	±	29	51	±	4
IFN3NM47	101	±	15	45	±	15
IFN4NM47	81	±	40	8	±	1
IFN4NMutNter	70	±	22	10	±	4
IFN3NM47/95	40	±	25	34	±	25
IFN3N47MutNter	46	±	17	16	±	2

2.5. Clonado de las líneas celulares CHO productoras de IFN2NM47/95, IFN3NM47, IFN4NM47, IFN4NMutNter, IFN3NM47/95 e IFM3N47MutNter. Caracterización y selección de los clones productores

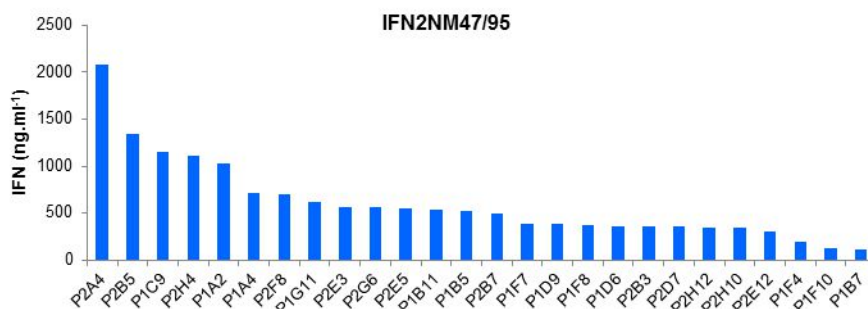
Las líneas celulares CHO re-Td IFN2NM47/95 (250), CHO re-Td IFN3NM47 (250), CHO re-Td IFN4NM47 (250), CHO re-Td IFN4NMutNter (250), CHO Td IFN3NM47/95 (200) y CHO Td IFN3N47MutNter (200) fueron clonadas mediante el método de dilución límite a los fines de obtener clones celulares que permitan llevar a cabo la producción de muteínas con características homogéneas y reproducibles.

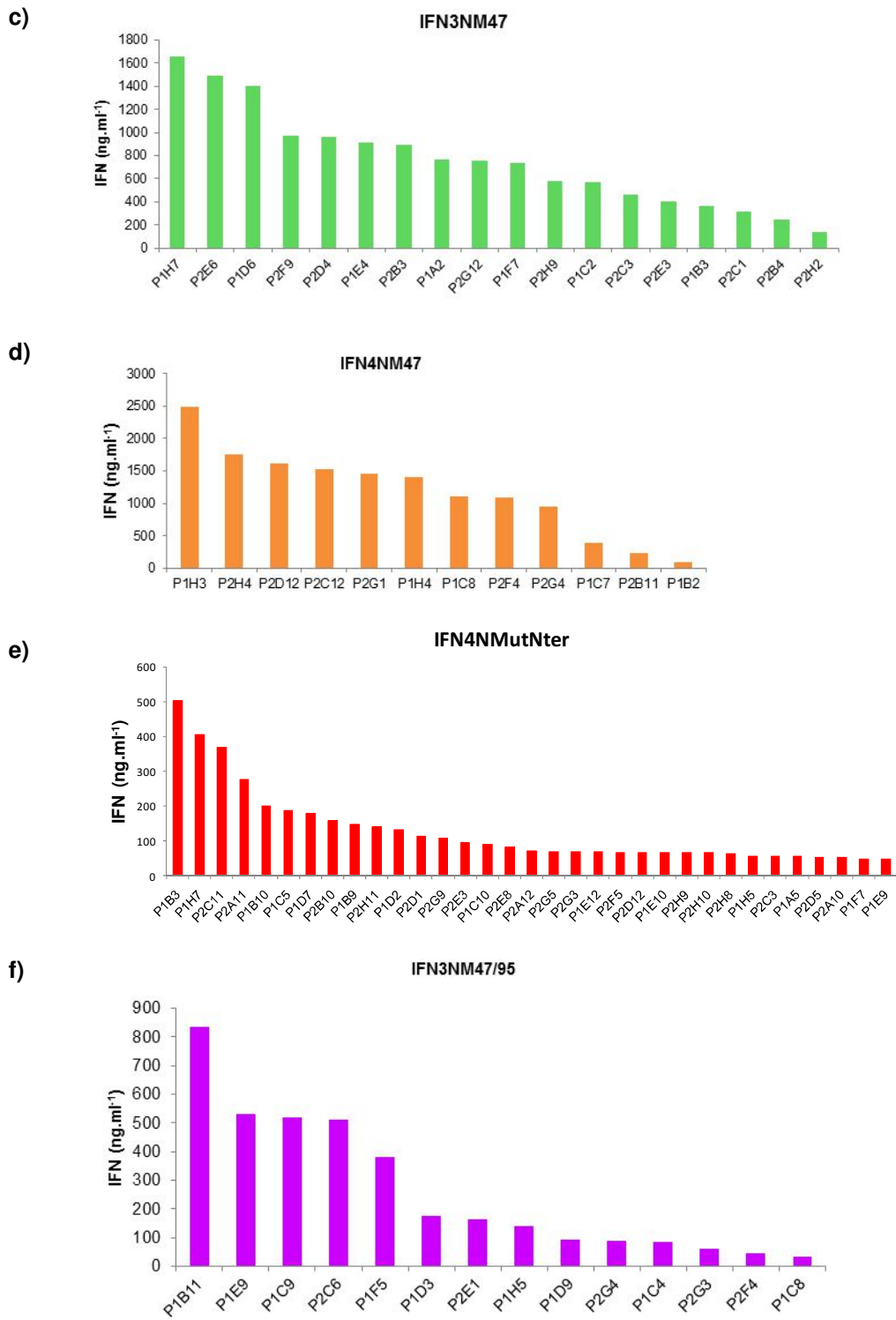
A los 15 días de comenzado el procedimiento de clonado se recolectó el sobrenadante de cultivo de los pozos seleccionados para su cuantificación mediante ELISA sándwich. Los resultados se muestran en la Fig. 56.

a)



b)





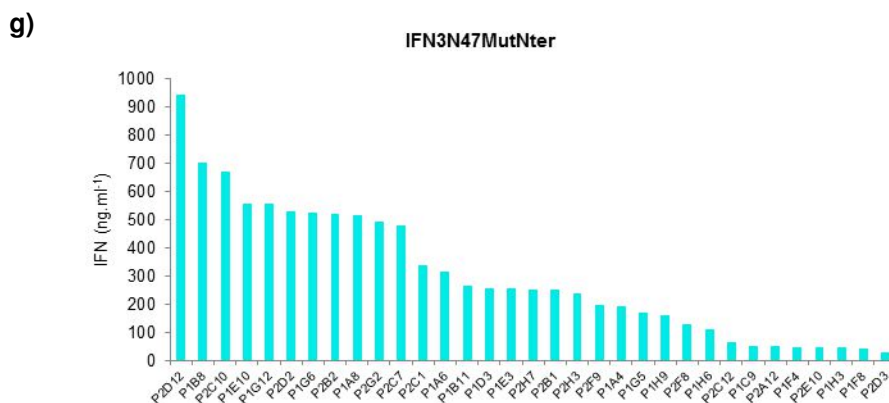


Fig. 56. Screening del clonado de las diferentes líneas celulares establecidas productoras de IFN2NM47/95, IFN3NM47, IFN4NM47, IFN4NMutNter, IFN3NM47/95 e IFN3N47MutNter

Los sobrenadantes de cultivo fueron cosechados a los 15 días y cuantificados mediante ELISA sándwich.

- a) CHO re-Td IFNwtMutNter (250)
- b) CHO re-Td IFN2NM47/95 (250)
- c) CHO re-Td IFN3NM47 (250)
- d) CHO re-Td IFN4NM47 (250)
- e) CHO re-Td IFN4NMutNter (250)
- f) CHO Td IFN3NM47/95 (200)
- g) CHO Td IFN3N47MutNter (200)

Luego del primer *screening*, se procedió a realizar un segundo análisis más detallado a partir de 6 clones de cada línea celular. Este segundo *screening* consistió en analizar la producción específica y el grado de glicosilación de las muteínas producidas por cada uno de ellos, cultivando el correspondiente clon por duplicado en placas de 12 cavidades.

Tabla XV. Determinación de la producción específica correspondiente a 6 clones de células CHO productores de IFN2NM47/95, IFN3NM47, IFN4NM47, IFN4NMutNter, IFN3NM47/95 e IFN3N47MutNter

Muteína	Clon	Producción específica (ng.10 ⁶ cél ⁻¹ .día ⁻¹)
IFN2NM47/95	P2A4	2618
	P1C9	2028
	P1A2	1894
	P2H4	1167
	P2B5	1064
	P1A4	250
IFN3NM47	P1D6	1294
	P2F9	1127
	P2E6	726
	P1H7	695
	P1E4	648
	P2D4	544

IFN4NM47	P2D12	588
	P2C12	388
	P2H4	363
	P1H4	298
	P1H3	271
	P2G1	253
IFN4NMutNter	P1H7	221
	P1B3	206
	P2C11	174
	P1B10	133
	P1C5	108
	P2A11	82
IFN3NM47/95	P1E9	1349
	P1B11	1251
	P1C9	789
	P2C6	762
	P1F6	319
	P1D3	713
IFN3N47MutNter	P2C10	1492
	P2D2	460
	P1B8	386
	P2D12	336
	P1G12	310
	P1E10	216

En general se observó que la producción específica osciló entre $8,2 \cdot 10^{-2}$ a $2,6 \cdot 10^{-6} \mu\text{g} \cdot \text{cél}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ (Tabla XV). Es importante tener en cuenta que estos valores fueron obtenidos mediante ensayos de ELISA sándwich que, como fue descrito anteriormente, producen una subvaloración en la determinación de la concentración de las muteínas hiperglicosiladas. Es decir que las producciones específicas mencionadas podrían, en realidad, ser superiores teniendo en cuenta el factor indicado en la Tabla XII.

Posteriormente, se realizaron ensayos de SDS-PAGE/*wb*, que permitieron evaluar el perfil electroforético de las moléculas producidas por cada clon en forma comparativa con la variante producida por la línea celular de origen y con el IFN4N (Fig.57).

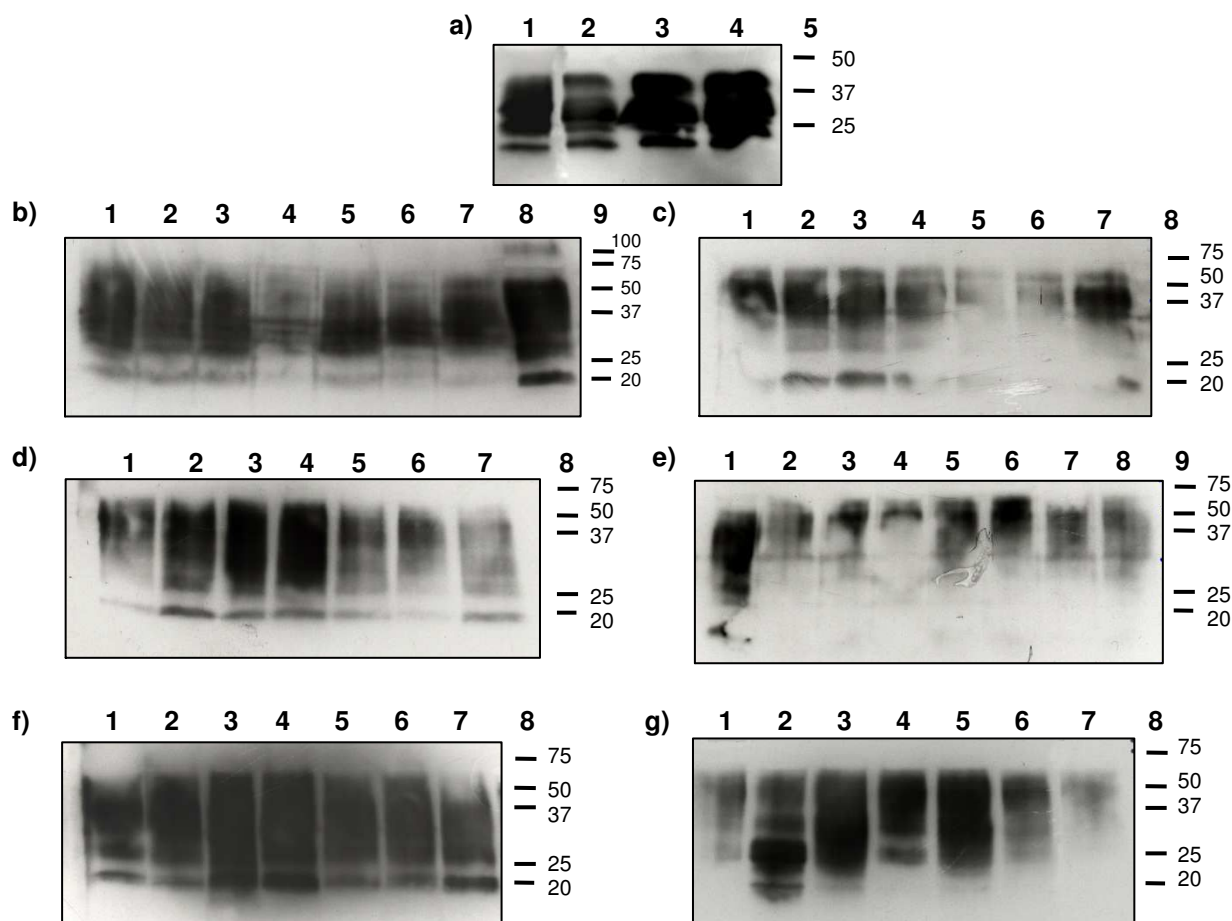


Fig. 57. Evaluación del grado de glicosilación de las muteínas del hIFN- α 2b producidas por diferentes clones

Se sembraron sobrenadantes de cultivo de 6 clones celulares derivados de las líneas celulares productoras de: (a) IFNwtMutNter, (b) IFN2NM47/95, (c) IFN3NM47, (d) IFM3NM47/95, (e) IFN4NM47, (f) IFN3N47MutNter y (g) IFN4NMutNter.

Las muestras sembradas fueron:

- a) Línea celular (1), P1H5 (2), P1A9 (3), P2G9 (4)
- b) Línea celular (1), P1C9 (2), P1A2 (3), P1A4 (4), P2A4 (5), P2B5 (6), P2H4 (7), SN IFN4N (8)
- c) Línea celular (1), P1H7 (2), P1D6 (3), P1E4 (4), P2E6 (5), P2F9 (6), P2D4 (7)
- d) Línea celular (1), P1E9 (2), P1B11 (3), P1C9 (4), P2C6 (5), P1F6 (6), P1D3 (7)
- e) SN IFN4N (1), Línea celular (2), P1H3 (3), P2H4 (4), P2D12 (5), P2C12 (6), P2G1 (7), P1H4 (8)
- f) Línea celular (1), P2D12 (2), P1B8 (3), P2C10 (4), P1E10 (5), P1G12 (6), P2D2 (7)
- g) Línea celular (1), P2C11 (2), P1B3 (3), P1B10 (4), P1H7 (5), P1C5 (6), P2A11 (7)

En función de los resultados de productividad y SDS-PAGE/*wb* se seleccionaron 3 clones productores de cada muteína para proceder a la caracterización de la ABE evaluada *in vitro*. Los clones seleccionados fueron: P1C9, P2H4 y P1A2 para IFN2NM47/95; P2D4, P1D6 y P2F9 para IFN3NM47; P1E9, P1B11 y P1C9 para IFN3NM47/95; P1H4, P2H4 y P2C12 para IFN4NM47; P2D12, P1B8 y P2C10 para IFN3N47MutNter; y finalmente P1H7, P1B3 y P2C11 para IFN4NMutNter.

A partir de sobrenadantes de cultivo provenientes de cada uno de los clones elegidos se realizaron ensayos de AB antiviral y antiproliferativa *in vitro*. Considerando los

resultados de la cuantificación de cada muteína, obtenidos mediante ELISA de competición, se calcularon las ABE correspondientes (Tabla XVI).

Tabla XVI. Análisis de la ABE antiviral y antiproliferativa *in vitro* de las muteínas producidas por los 3 clones de células CHO seleccionados

Muteína	Clon	ABE (UI.ng ⁻¹)					
		Antiviral			Antiproliferativa		
IFNwtMutNter	P1H5	137	±	36	66	±	28
	P1A9	124	±	32	68	±	32
	P2G9	143	±	47	69	±	31
IFN2NM47/95	P1C9	65	±	20	46	±	22
	P1A2	70	±	29	47	±	20
	P2H4	46	±	22	33	±	20
IFN3NM47	P1D6	47	±	15	23	±	10
	P2F9	42	±	20	20	±	7
	P2D4	41	±	12	27	±	17
IFN3NM47/95	P1B11	47	±	16	20	±	9
	P1C9	39	±	14	15	±	8
	P1E9	49	±	16	26	±	16
IFN4NM47	P1H4	42	±	20	3	±	1
	P2H4	43	±	22	3	±	1
	P2C12	43	±	9	4	±	1
IFN3N47MutNter	P2D12	54	±	12	29	±	17
	P1B8	22	±	7	12	±	6
	P1C10	30	±	14	21	±	5
IFN4NMutNter	P1H7	28	±	15	13	±	6
	P2C11	28	±	6	13	±	6
	P1B3	29	±	11	12	±	5

En negrita se resaltan los clones seleccionados para la etapa de producción.

Sobre la base de los resultados obtenidos, se seleccionaron los clones que presentaron un valor de producción específica elevado así como también ABE *in vitro* y grado de glicosilación apropiados. De este modo, los clones elegidos para proceder a la etapa de producción fueron: IFNwtMutNter P1H5, IFN2NM47/95 P2H4, IFN3NM47 P2F9, IFN3NM47/95 P1E9, IFN4NM47 P2C12, IFN3N47MutNter P2C10 e IFN4NMutNter P1H7.

2.6. Producción de IFNwtMutNter, IFN2NM47/95, IFN3NM47, IFN4NM47, IFN4NMutNter, IFN3NM47/95 e IFN3N47MutNter mediante el cultivo de los clones seleccionados en condiciones de adherencia

La producción de las nuevas variantes hiperglicosiladas del hIFN- α 2b se realizó en frascos T triples de 500 cm² de superficie, utilizando cultivos en fase estacionaria y realizando recambios cada 48 h o 72 h con medio de cultivo fresco suplementado con SFB 0,5% (V/V). La presencia de este suplemento en menor proporción respecto al medio de crecimiento facilitó la posterior purificación de las muteínas y a su vez resultó suficiente para permitir que las células se mantengan adheridas. Por otra parte, durante el transcurso de la etapa de producción se observó el fenómeno de formación de cúmulos; sin embargo, esto

no afectó la productividad de la molécula de interés. Los sobrenadantes de cultivo correspondientes a las cosechas de las diferentes muteínas de hIFN- α 2b fueron cuantificados mediante ELISA sándwich (Fig. 58). Luego de llevar a cabo entre 9 a 11 cosechas de los diferentes cultivos (un período de aproximadamente 21 a 28 días), los mismos fueron discontinuados.

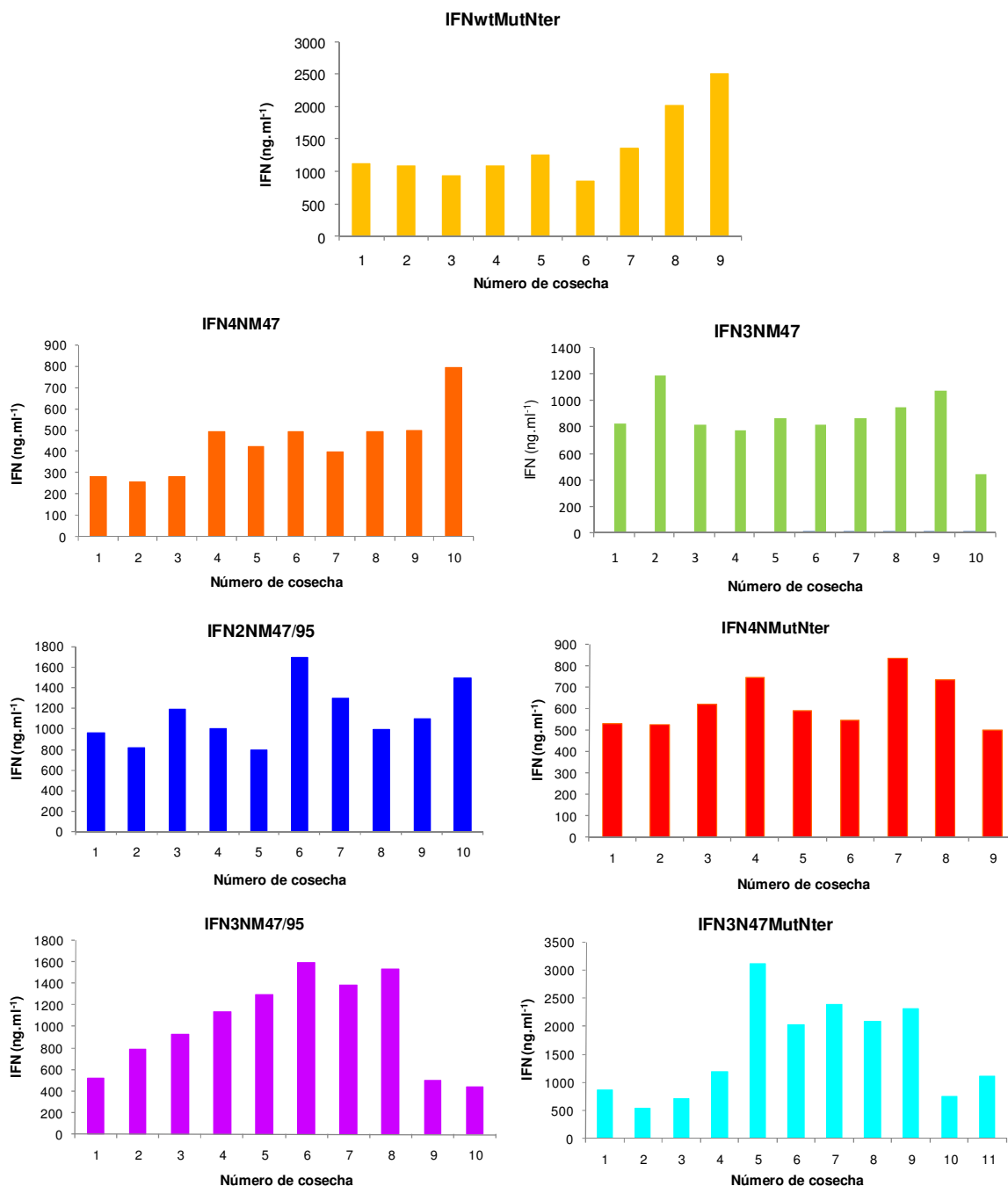


Fig. 58. Evolución de la concentración de las variantes hiperglicosiladas del hIFN- α 2b presentes en los sobrenadantes de cultivo cosechados durante la etapa de producción.

La concentración de las variantes IFNwtMutNter (●), IFN2NM47/95 (●), IFN3NM47 (●), IFN4NM47 (●), IFN4NMutNter (●), IFN3NM47/95 (●) e IFN3N47MutNter (●) se determinó mediante ELISA sándwich.

2.7. Purificación de IFNwtMutNter, IFN2NM47/95, IFN3NM47, IFN4NM47, IFN4NMutNter, IFN3NM47/95 e IFN3N47MutNter mediante cromatografía de inmunoafinidad

Teniendo en cuenta la necesidad de asegurar la identidad de cada variante hiperglicosilada del hIFN- α 2b fue necesario trabajar con matrices para purificación por CIA individuales para cada una de ellas, de manera de evitar contaminaciones cruzadas en el producto purificado final. Para esta segunda etapa del trabajo de tesis se generó un volumen de 35 ml de resina de inmunoafinidad mediante el acoplamiento del mAb CA5E6 a *Sepharose*TM activada con CNBr siguiendo el protocolo indicado en la sección 6.3.4 de M&M. De este modo, se contó con material para purificar las 7 muteínas empleando 5 ml de matriz para cada una de ellas.

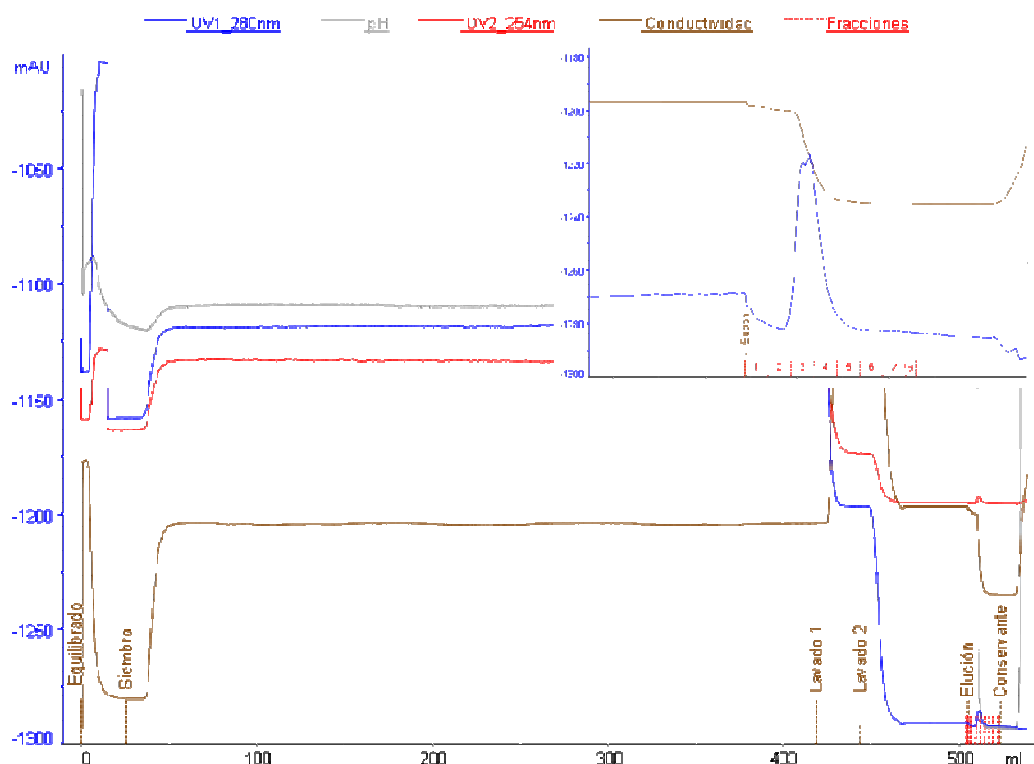


Fig. 59. Purificación del IFN3NM47/95 mediante CIA

Todas las variantes fueron purificadas a partir de sobrenadantes de cultivo de las cosechas obtenidas durante la etapa de producción. A modo de ejemplo, se muestra el cromatograma correspondiente a la muteína IFN3NM47/95, visualizándose los registros de absorbancia a 280 nm (rojo), absorbancia a 260 nm (azul), conductividad (marrón) y fracciones recolectadas (barras verticales en línea recortada). En la esquina superior derecha se muestra una ampliación del pico de elución.

Teniendo en cuenta que la capacidad dinámica de la resina generada, calculada en la sección 1.7.1 fue de 158 μ g de IFN4N por ml de gel húmedo, se asumió que la capacidad dinámica de las nuevas resinas podría ser similar, es decir, aproximadamente 792 μ g IFN4N

(calculada por ELISA de competición). De esta manera, la totalidad de las cosechas obtenidas para cada muteína fueron purificadas en 4 - 5 etapas, trabajando con una masa sembrada por debajo de la capacidad dinámica de la resina para evitar pérdidas. La recuperación de las muteínas luego del proceso de purificación fue evaluada mediante ensayos de ELISA sándwich. En general, las recuperaciones de las fracciones de elución fueron superiores al 88%, observándose pérdidas del material de interés tanto en el *FT* como así también en los lavados. En la Fig. 59 se muestra a modo de ejemplo el cromatograma de la purificación de IFN3NM47/95 y en la tabla XVII el rendimiento de cada una de las etapas correspondientes a una purificación representativa de cada variante del hIFN- α 2b.

Tabla XVII. Rendimiento de la purificación mediante CIA de las diferentes muteínas

Muteína	<i>FT</i> (%)	Lavados (%)	Elución (%)
IFNwtMutNter	0,2	-	94
IFN2NM47/95	0,2	0,4	99
IFN3NM47	3	4	88
IFN4NM47	5	2	93
IFN4NMutNter	0,1	0,3	96
IFN3NM47/95	-	0,5	97
IFN3N47MutNter	0,4	0,4	99

En la Tabla XVIII se resumen las concentraciones de cada eluato luego del proceso de concentración y diafiltración. Se incluye, además, la pureza de todas las variantes del hIFN- α 2b analizada mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras con posterior tinción con azul brillante de *Coomassie*. En general, se observó que los principales contaminantes evidenciaron una masa molecular superior al máximo tamaño molecular observado para las muteínas hiperglicosiladas del hIFN- α 2b (Fig. 60a). Dichos contaminantes se identificaron bajo la forma de dos bandas de 66 kDa y de 55 kDa, probablemente correspondientes a albúmina sérica bovina (principal constituyente del SFB utilizado como suplemento del medio de cultivo) y a la cadena pesada de IgG, respectivamente. La determinación de pureza se realizó mediante densitometría de las bandas coloreadas, observándose un rango de purezas entre 81 y 98%, lo cual se consideró óptimo y adecuado para continuar con los siguientes análisis (Tabla XVIII).

Tabla XVIII. Cálculo de la concentración, masa total obtenida y grado de pureza de las muteínas del hIFN- α 2b purificadas mediante CIA

Muestra	Concentración (mg.ml ⁻¹)	Masa total obtenida (mg)	Pureza (%)
IFNwtMutNter	2,7	1,8	81
IFN2NM47/95	3,1	3,1	97
IFN3NM47	2,4	2,3	97
IFN4NM47	1,9	1,8	94
IFN4NMutNter	1,9	1,9	94
IFN3NM47/95	1,8	2,7	95
IFN3N47MutNter	2,3	3,4	98

2.8. Caracterización fisicoquímica de las variantes glicosiladas del hIFN- α 2b

En primera instancia se llevó a cabo la evaluación de la masa molecular aparente de las nuevas muteínas del hIFN- α 2b utilizando el ensayo de SDS-PAGE en condiciones reductoras, seguido de tinción con colorante azul brillante de *Coomasie* (Fig. 60a).

En la Fig. 60a se observa claramente que al incrementar el número de sitios potenciales para N-glicosilación la masa molecular máxima obtenida para cada variante resultó mayor. Al N-deglicosilar todas las muteínas se observó que sus masas moleculares disminuyeron alcanzando un valor semejante al correspondiente para el IFNwt. Este resultado confirmó que, efectivamente, la elevada masa molecular alcanzada por las nuevas muteínas del hIFN- α 2b se debió a la presencia de glúcidos unidos mediante enlace de tipo N (Fig. 60b).

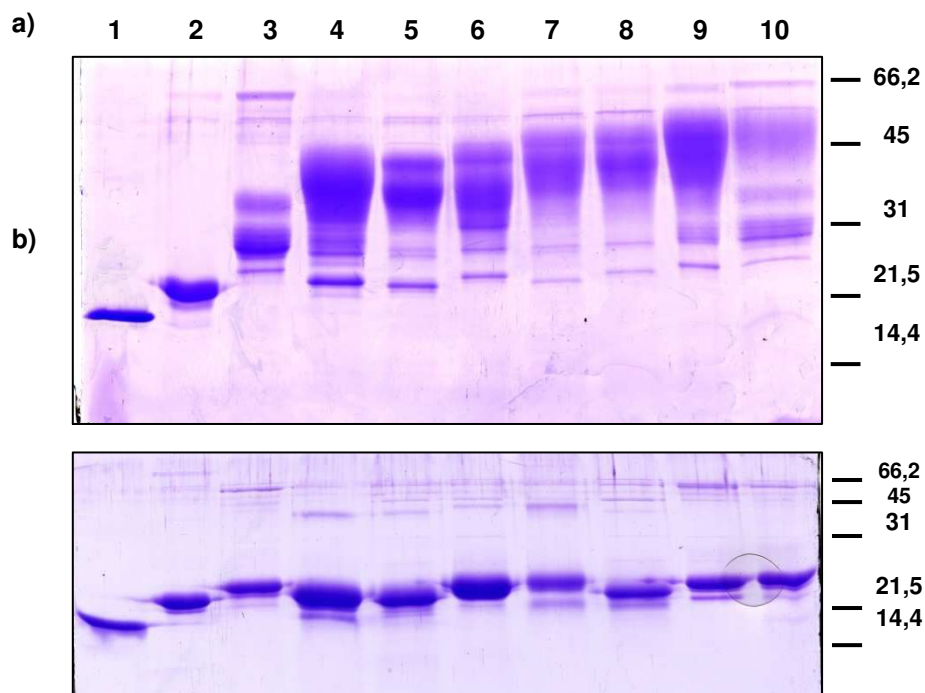


Fig. 60. Masa molecular aparente de las muteínas hiperglicosiladas del hIFN- α 2b evaluadas mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras seguido de tinción con azul brillante de *Coomasie*. Análisis de las muestras pre (a) y postdigestión (b) con PNGasa F

La masa molecular aparente de las muteínas purificadas fue comparada con el hIFN- α 2b no glicosilado, hIFN- α 2bwt e IFN4N. La digestión con PNGasa F permitió concluir acerca de la gran influencia que tienen los glúcidos sobre la masa molecular aparente de las diferentes variantes hiperglicosiladas.

Calles:	1:	rhIFN- α 2b no glicosilado
	2:	IFNwt
	3:	IFNwtMutNter
	4:	IFN4N
	5:	IFN3NM47
	6:	IFN2NM47/95
	7:	IFN4NM47
	8:	IFN3NM47/95
	9:	IFN3N47MutNter
	10:	IFN4NMutNter

Posteriormente, se evaluó el perfil de isoformas de diferente pI de las variantes hiperglicosiladas del hIFN- α 2b mediante la realización de un ensayo de IEF (Fig. 61).

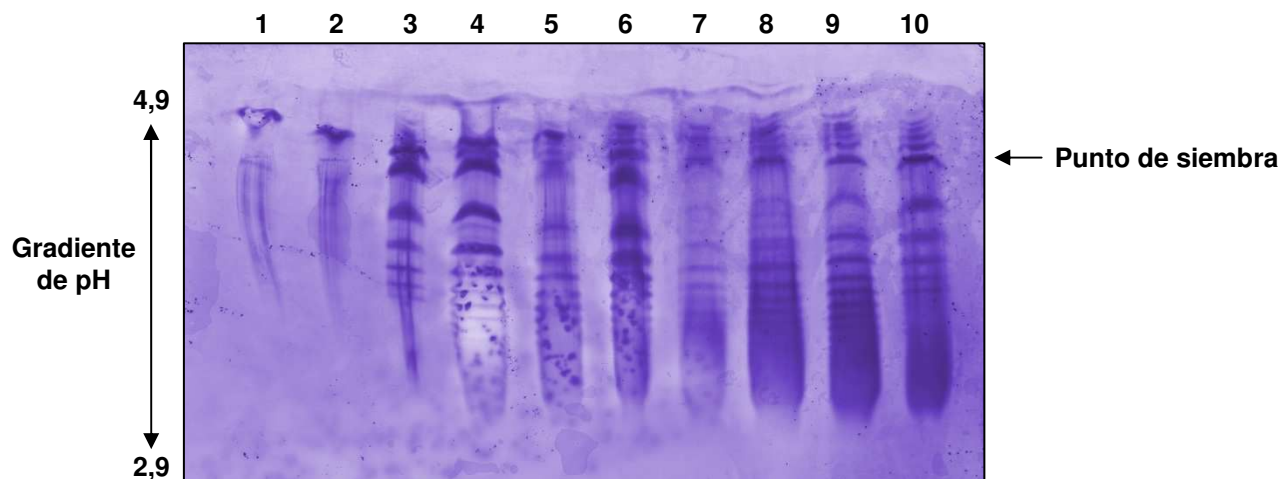


Fig. 61. Análisis del patrón de isoformas y su distribución a lo largo del gradiente de pH establecido en un ensayo de IEF.

Se realizó un ensayo de IEF seguido de tinción con azul brillante de *Coomasie* coloidal para evaluar el patrón de isoformas de las variantes hiperglicosiladas del hIFN- α 2b.

- Calles:
- 1: rhIFN- α 2b no glicosilado
 - 2: IFNwt
 - 3: IFNwtMutNter
 - 4: IFN4N
 - 5: IFN3NM47
 - 6: IFN2NM47/95
 - 7: IFN4NM47
 - 8: IFN3NM47/95
 - 9: IFN3N47MutNter
 - 10: IFN4NMutNter

Este ensayo permitió confirmar que, a medida que se incrementó el número de sitios potenciales de N-glicosilación, el pI de la proteína disminuyó, posiblemente debido a la presencia de un mayor contenido de ácido siálico que contribuye a un incremento en la carga neta negativa de la proteína.

Ambos ensayos permitieron llegar a la conclusión de que el incremento en el número de sitios potenciales para N-glicosilación resultó no sólo en un incremento de la masa molecular aparente de la proteína, sino también de su carga neta negativa.

Nuestros resultados demostraron concordancia con lo observado en la bibliografía para otras proteínas recombinantes como rhEPO y rhFSH, para las cuales la adición de 1 o más sitios potenciales de N-glicosilación condujo a un aumento del tamaño de la proteína y de su carga negativa (Egrie y Browne, 2001; Elliot y col., 2003; Weenen y col., 2004). Por otra parte, un estudio de mutagénesis realizado sobre la cadena liviana de un mAb con actividad neutralizante del HIV-1 también demostró la utilidad de esta tecnología para aumentar la masa molecular aparente de la proteína en estudio (Song y col., 2013). A su

vez, la utilidad del péptido ANITVNITV para incrementar la masa molecular de la proteína en estudio y disminuir su pl fue demostrada previamente por Perlman y col. (2003), quienes lo utilizaron para la modificación de rhFSH.

2.9. Análisis del contenido de ácido siálico y del contenido de glicanos neutros y cargados de las muteínas glicosiladas del hIFN- α 2b

El contenido de ácido siálico de las muteínas fue evaluado mediante HPAEC-PAD (Tabla XIX). En general se observó que al introducir un mayor número de sitios potenciales para N-glicosilación se evidenció un contenido superior de ácido siálico, lo cual es un comportamiento esperado debido a la mayor disponibilidad de antenas susceptibles de ser modificadas con moléculas terminales de ácido siálico. De este modo, las variantes con un mayor número de sitios potenciales de N-glicosilación (todas las 5N: IFN3NM47/95 e IFN4NM47 y una de las 6N: IFN3N47MutNter) evidenciaron un contenido superior de Neu5Ac respecto a las muteínas 4N (IFN4N, IFN3NM47 e IFN2NM47/95). Por ejemplo, las muteínas 5N y 6N demostraron en promedio una cantidad 1,7 veces mayor de Neu5Ac que la molécula 4N de referencia de este trabajo (IFN4N).

Por otro lado, las muteínas 5N y la 6N antes mencionadas, no sólo presentaron los valores más altos de Neu5Ac sino que los mismos fueron similares entre ellas a pesar de presentar diferencias en el número de sitios potenciales para N-glicosilación (Tabla XIX). Asimismo, moléculas conteniendo el mismo número de sitios susceptibles de N-glicosilación, como por ejemplo las muteínas 4N, no evidenciaron diferencias significativas a nivel de la cantidad de Neu5Ac entre sí ni tampoco con una molécula de mayor contenido de tales sitios como la muteína 6N denominada IFN4NMutNter. Esto podría estar indicando cierta influencia del entorno proteico y del arreglo de los glúcidos en la incorporación del ácido siálico. Además, todas las variantes demostraron, en mayor o menor medida, la presencia del ácido siálico antigénico Neu5Gc. Esto, evidentemente, es una consecuencia del huésped de producción (Tabla XIX), tal como se discutiera en la sección 1.8.2.1, en la que no se detectó la presencia de la mencionada molécula de ácido siálico en la proteína IFN4N producida en células HEK pero sí en CHO.

Específicamente, la introducción del péptido ANITVNITV en el IFNwt permitió incrementar el contenido de Neu5Ac en aproximadamente 1 mol.mol de proteína⁻¹. Dicha modificación también condujo al incremento de Neu5Gc. Por otra parte, a pesar de que el contenido de Neu5Ac de las variantes 4N no fue significativamente diferente entre ellas, sí se observó un incremento del contenido de Neu5Gc para las nuevas muteínas IFN3NM47 e IFN2NM47/95.

En términos generales, se observó que conforme aumentó el contenido de Neu5Ac también se incrementó el Neu5Gc. Sin embargo, la proporción de Neu5Gc respecto del contenido de ácido siálico total se mantuvo entre 1 y 3,8%, siendo 2% para el IFNwt.

Tabla XIX. Análisis del contenido de Neu5Ac y Neu5Gc correspondiente a muestras purificadas de las nuevas muteínas hiperglicosiladas del hIFN- α 2b

Muestra	Neu5Ac			Neu5Gc		
	(mol.mol proteína ⁻¹)			(mol.mol proteína ⁻¹)		
IFNwt	2,5	±	0,7	0,05	±	0,02
IFNwtMutNterm	3,4	±	0,9	0,08	±	0,01
IFN4N	7,9	±	1,1	0,07	±	0,02
IFN3NM47	9,0	±	0,7	0,29	±	0,01
IFN2NM47/95	8,3	±	0,5	0,18	±	0,01
IFN3NM47/95	14,0	±	1,1	0,46	±	0,05
IFN4NM47	12,8	±	1,6	0,49	±	0,01
IFN4NMutNterm	9,1	±	1,4	0,19	±	0,02
IFN3N47MutNterm	13,5	±	2,0	0,21	±	0,05

Al analizar los N-glicanos neutros y cargados mediante WAX, los cromatogramas obtenidos para cada una de las muestras evidenciaron perfiles de elución similares. En todas las muestras se pudieron visualizar 6 grupos de glicanos correspondientes a estructuras neutras, monosialiladas, de tipo alta manosa, bisialiladas, trisialiladas y tetrasialiladas. Además, la cantidad de picos observados, su distribución y proporción fue parecida entre todas las muestras (Fig. 62). Este resultado estaría indicando la robustez del proceso de glicosilación de las células CHO, ya que las estructuras predominantes parecerían ser similares.

En la Fig. 63 se observa predominio de glicanos bi-, tri- y tetrasialilados (barras magenta, celeste y naranja) en todas las muteínas estudiadas, los cuales constituyeron más del 75% de los glúcidos, mientras que glicanos neutros, monosialilados y de tipo alta manosa constituyeron las estructuras restantes. Además, en todas ellas se observó muy baja presencia de glicanos de tipo alta manosa fosforilados (menor al 5%).

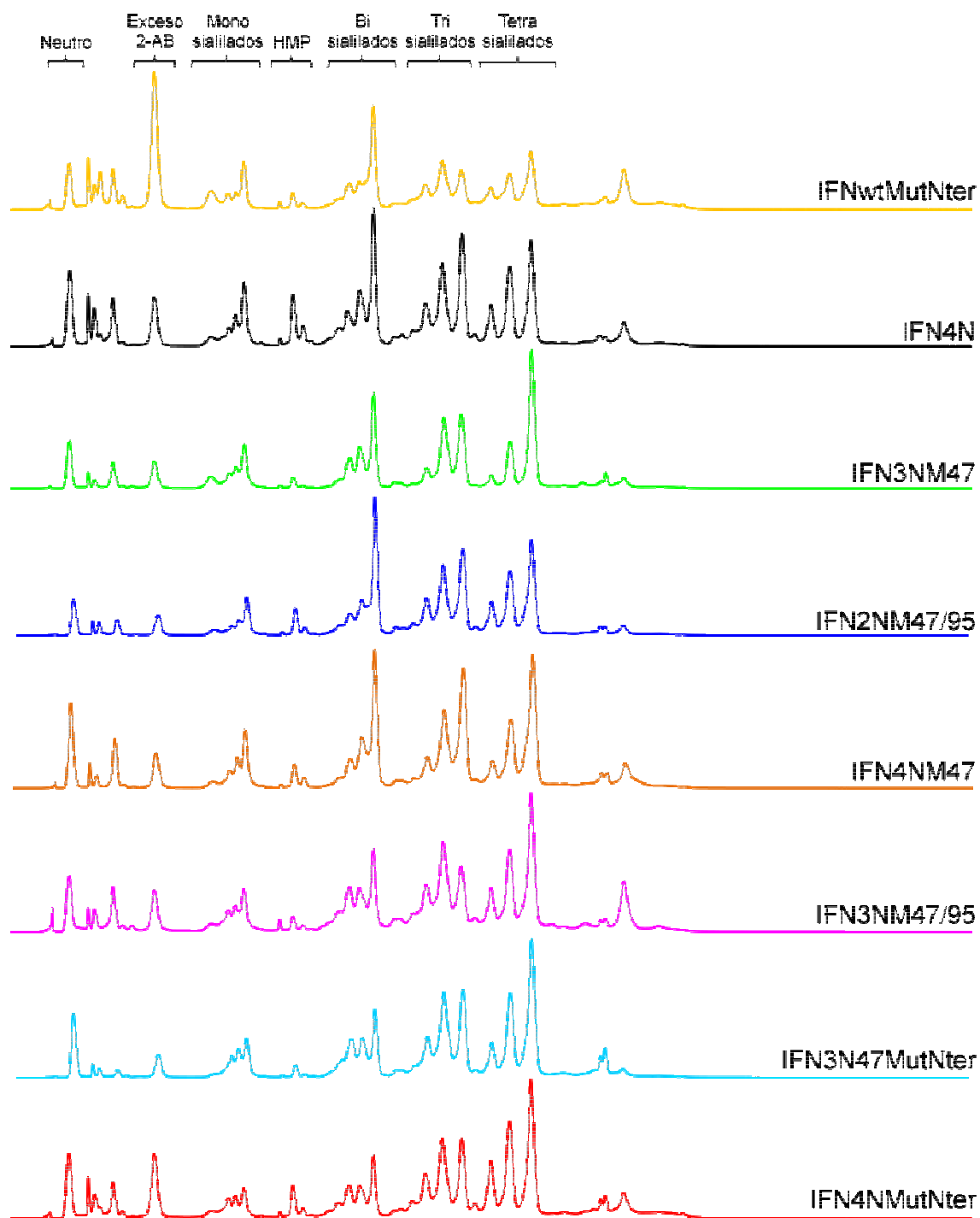


Fig. 62. Evaluación de glicanos neutros y cargados mediante WAX de las variantes hiperglicosiladas del hIFN- α 2b

Los diferentes colores de los cromatogramas indican las cromatografías de las distintas muteínas. En el borde superior, mediante la utilización de llaves, se marcan los grupos de estructuras correspondientes a glicanos neutros, monosialilados, alta manosa fosforilados (HMP), bisialilados, trisialilados y tetrasialilados. Además se indica el pico correspondiente al exceso del fluoróforo 2-AB que no pudo ser eliminado luego del proceso de marcación.

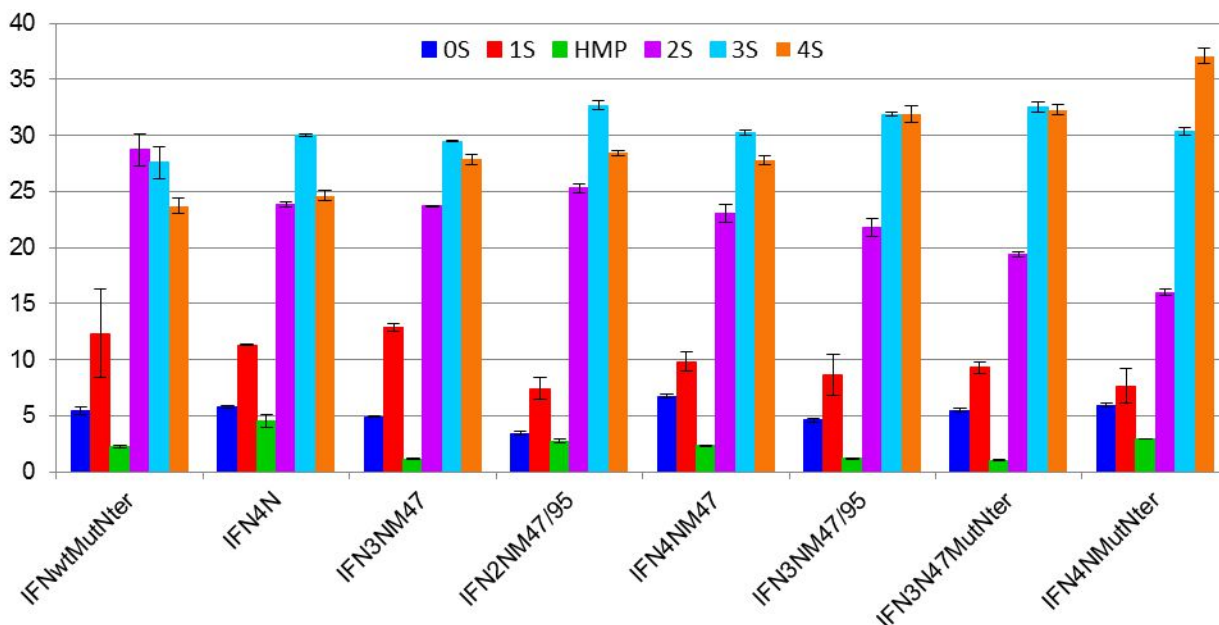


Fig. 63. Proporción de glicanos neutros y cargados en muestras purificadas de las variantes glicosiladas del hIFN- α 2b evaluados mediante WAX

Se muestra la proporción de glicanos neutros (0S), monosialilados (1S), alta manosa fosforilados (HMP), bisialilados (2S), trisialilados (3S) y tetrasialilados (4S) para cada una de las muteínas del hIFN- α 2b.

Teniendo en cuenta los grupos de muteínas propuestos podemos concluir que las nuevas variantes 4N (IFN3NM47 e IFN2NM47/95), correspondientes al grupo A, presentaron características muy similares a la variante de referencia. Asimismo, las muteínas del grupo B (IFN4NM47 e IFN4NMutNter) y del grupo C (IFN3NM47/95 e IFN3N47MutNter) evidenciaron un grado de glicosilación superior, con mayor contenido de ácido siálico, cumpliéndose el objetivo propuesto para cada uno de los grupos.

2.10. Caracterización biológica *in vitro* de las variantes glicosiladas del hIFN- α 2b

La determinación de la AB *in vitro* de las variantes del hIFN- α 2b se llevó a cabo mediante ensayos de AB antiviral y antiproliferativa. A partir de tales determinaciones se calculó la ABE de cada molécula considerando sus correspondientes concentraciones determinadas mediante lectura espectrofotométrica (Tabla XX).

Desde un punto de vista general, el incremento del número de sitios potenciales de N-glicosilación condujo a una disminución de la ABE de las moléculas. Particularmente, las modificaciones introducidas afectaron en mayor medida la capacidad antiproliferativa del IFN respecto de su acción antiviral. Tal comportamiento se observó para todas las muteínas, aunque la relación ABE antiviral / ABE antiproliferativa fue fundamentalmente mayor para aquellas muteínas que conservaron la mutación original R23N, como la molécula de referencia IFN4N y su variante IFN4NM47.

Tabla XX. Evaluación de la ABE antiviral y antiproliferativa *in vitro* de las muteínas hiperglicosiladas del hIFN- α 2b purificadas mediante CIA

Muteína	SPNglico *	ABE (UI.ng ⁻¹)						ABE AV/AP	
		Antiviral			Antiproliferativa				
IFNwt	0	241	±	90	191	±	72	1,3	n/s
IFNwtMutNter	2	105	±	29	46	±	13	2,3	***
IFN3NM47	4	82	±	25	33	±	14	2,5	*
IFN2NM47/95	4	43	±	11	25	±	17	1,7	n/s
IFN4NMutNter	6	41	±	23	20	±	4	2,1	n/s
IFN3N47MutNter	6	47	±	18	16	±	11	2,9	**
IFN3NM47/95	5	28	±	19	10	±	3	2,9	n/s
IFN4NM47	5	35	±	17	6	±	3	5,8	*
IFN4N	4	54	±	18	5	±	1	10,8	***

*SPNglico: sitios potenciales de N-glicosilación

Por un lado, la adición del péptido ANITVNITV a la secuencia del IFNwt afectó su ABE antiviral, reduciéndola en un 56%, mientras que la ABE antiproliferativa de la misma molécula se vio afectada en mayor medida, ya que se redujo en un 76%. Asimismo, la adición de mencionado péptido a la muteína IFN3NM47 redujo su ABE antiviral en un 43% y la ABE antiproliferativa en un 52%. Un efecto similar fue observado luego de la adición del mismo péptido al extremo N-terminal de la rhFSH, ya que condujo a una reducción de su ABE a un 77% (Perlman y col., 2003). Cabe destacar que en el mismo trabajo se demostró que el descenso de la ABE *in vitro* no afectó la potencia *in vivo* sino que, contrariamente, la mejoró, prolongando su accionar. Sin embargo, la adición del péptido ANITVNITV a la molécula de IFN4N mejoró notablemente su ABE antiproliferativa, no así la antiviral. De este modo, la relación entre ABE antiproliferativa y antiviral se redujo de 10,8 para IFN4N a 2,1 para IFN4NMutNterm. Este último valor resultó muy similar a la relación correspondiente a IFNwt e IFNwtMutNterm. Es decir, si consideramos que la ABE antiviral no fue prácticamente afectada por la adición del péptido a la molécula de IFN4N, sería posible concluir que la secuencia peptídica ANITVNITV de alguna forma permitió corregir la pérdida de actividad antiproliferativa ocasionada por la presencia de la mutación R23N individualmente o, bien, de R23N en el contexto de las restantes mutaciones.

Al comparar las variantes con cuatro sitios potenciales de N-glicosilación o 4N (IFN4N, IFN3NM47 y IFN2NM47/95) se observa que la molécula IFN3NM47 es la que demostró una ABE antiviral superior a las demás. Esta variante carece de las mutaciones R23N y L95T. Evidentemente, la modificación de los aminoácidos mencionados y/o la introducción de N-glicanos en esos sitios particulares estarían influenciando negativamente la ABE de tales variantes. Trabajos de investigación realizados previamente en nuestro laboratorio sugirieron a la mutación R23N como la principal responsable en la disminución

de la ABE antiproliferativa y a la mutación L95T como responsable de un descenso parcial de ambas actividades del IFN4N (Ceaglio y col., 2008).

Como elemento distintivo de estos experimentos, en particular de la ABE antiproliferativa, se observó que la restauración del residuo Arg23 en la secuencia del IFN condujo a una mejora notable de tal parámetro en un rango comprendido entre 2 y 7 veces, considerando aquellas variantes con un grado similar o superior de N-glicosilación. Asimismo, es posible concluir que los grupos de muteínas, diseñados con el objetivo de cumplir determinados niveles de ABE antiproliferativa con respecto a la muteína original IFN4N, fueron concretados con éxito. En el grupo A, constituido por las muteínas IFN3NM47 e IFN2NM47/95, se logró superior ABE antiproliferativa con respecto a IFN4N. En el grupo B, constituido por IFN4NM47 e IFN4NMutNter, se pudo cumplir con la expectativa de que la ABE antiproliferativa fuera similar a IFN4N para la primera muteína. En forma sorprendente, la restante muteína de este grupo (IFN4NMutNter) exhibió una ABE antiproliferativa que superó ampliamente la correspondiente a IFN4N, como fuera comentado con anterioridad. Finalmente, dentro del grupo C, las muteínas IFN3NM47/95 e IFN3N47MutNter lograron mayor ABE antiproliferativa con respecto al IFN4N. De este modo, las variantes generadas resultaron atractivos candidatos para la posterior evaluación de sus propiedades farmacocinéticas y de potencia biológica *in vivo*.

Diversos estudios han demostrado la relevancia del mejoramiento de las proteínas recombinantes en términos de sus propiedades farmacocinéticas por sobre su actividad biológica *in vitro* a los fines de mejorar su *performance in vivo*. Podemos mencionar el caso de la NESP (Aranesp[®]), variante de la rhEPO con dos sitios adicionales de N-glicosilación que demostró un marcado incremento en su contenido de ácido siálico que condujo al mejoramiento de sus propiedades farmacocinéticas y, en consecuencia, a una mayor actividad biológica *in vivo* que permitió disminuir la frecuencia de administración durante el tratamiento de anemia (Egrie y Browne, 2001).

2.11. Análisis de las propiedades farmacocinéticas de las variantes glicosiladas del hIFN- α 2b

Con el objetivo de evaluar la contribución que las nuevas modificaciones introducidas en la secuencia del hIFN- α 2b ejercen a nivel de sus propiedades farmacocinéticas, se llevaron a cabo ensayos *in vivo* en ratas Wistar hembras. Para el análisis farmacocinético (Fig. 64) se adoptó un modelo monocompartimental para el cálculo de los parámetros: concentración plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$), tiempo necesario para alcanzarla ($T_{m\acute{a}x}$), vida media plasmática ($t_{1/2}$), *clearance* plasmático aparente (CL_{app}) y área bajo la curva (AUC) (Tabla XXI). Las diferencias entre los tratamientos ensayados fueron evaluadas mediante la aplicación del test-t paramétrico. Particularmente, para la

comparación de los $T_{m\acute{a}x}$ se aplicó el test no-paramétrico Wilcoxon-Mann-Whitney. Los parámetros fueron considerados significativamente diferentes cuando $p < 0,05$.

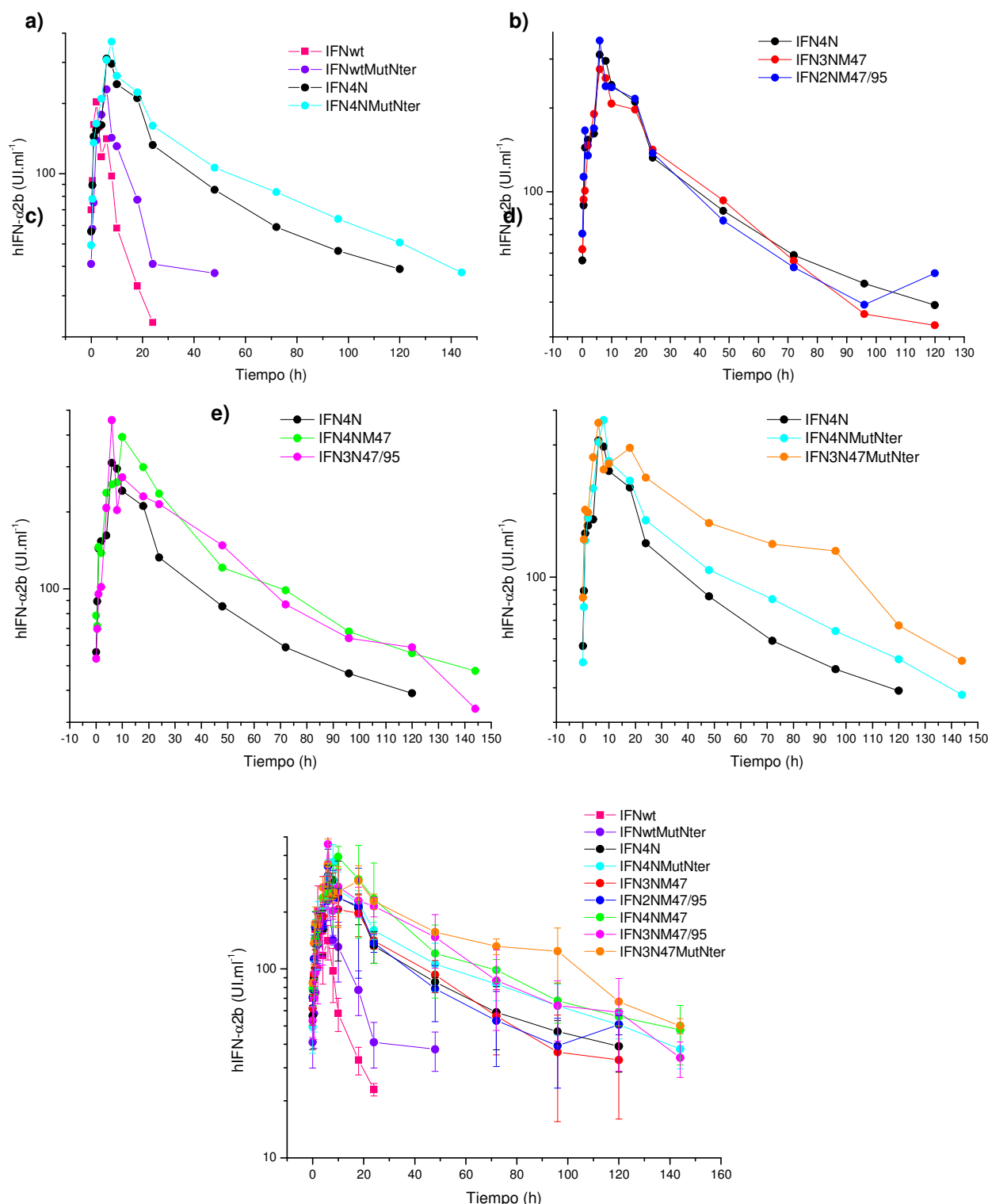


Fig. 64. Perfil farmacocinético de las muteínas glicosiladas del hIFN- α 2b evaluado en animales de experimentación luego de su inyección subcutánea.

Se graficó la AB antiviral de las variantes IFNwt (\square), IFNwtMutNter (\circ), IFN4N (\bullet), IFN4NMutNter (\circ), IFN3NM47 (\bullet), IFN2NM47/95 (\bullet), IFN4NM47 (\bullet), IFN3NM47/95 (\bullet) e IFN3N47MutNter (\bullet) en función del tiempo transcurrido desde la inyección. Los resultados para cada tiempo se muestran como el promedio \pm SD ($n=4$). En las diferentes gráficas se comparan: a) IFN4N e IFNwt con las correspondientes muteínas modificadas con el péptido ANITVNIIV; b) Muteínas 4N; c) Muteínas 5N; d) Muteínas 6N; e) Todas las muteínas

La Fig. 64a muestra cómo la introducción del péptido permite mejorar notablemente las propiedades farmacocinéticas de las correspondientes moléculas no modificadas (IFNwt e IFN4N). Se evidenciaron diferencias significativas entre el $t_{1/2}$, $T_{m\acute{a}x}$, CL_{app} y AUC del IFNwt y del IFNwtMutNter ($p=0,0017$; $p=0,0269$; $p=0,0021$ y $p=0,0068$; respectivamente), no así en los valores de $C_{m\acute{a}x}$. Por otra parte, el análisis comparativo del IFN4N y del IFN4NMutNter indicó la existencia de diferencias significativas en su $T_{m\acute{a}x}$, AUC y CL_{app} ($p=0,011$; $p=0,0079$ y $0,0157$, respectivamente), mientras que no se observaron diferencias estadísticas en los demás parámetros. El análisis de los valores de CL_{app} indicó la existencia de una mayor disminución de dicho parámetro al conjugar el péptido con IFNwt que al conjugarlo al IFN4N (descenso del 52% y 24%, respectivamente). Los cambios que los nuevos glicanos imprimieron en las propiedades fisicoquímicas y, en consecuencia, en las propiedades farmacocinéticas de IFNwt e IFN4N fueron más notorios en la primera molécula (que originalmente sólo poseía O-glicanos) con respecto a la segunda molécula que ya poseía, además, glicanos de tipo N.

En la Fig. 64b se muestran los perfiles farmacocinéticos para las variantes 4N, observándose gran similitud entre ellos. El análisis estadístico reveló que no existen diferencias significativas entre ninguno de los 5 parámetros estudiados: $t_{1/2}$, $T_{m\acute{a}x}$, $C_{m\acute{a}x}$, AUC y CL_{app} . Evidentemente, la similitud glicosídica alcanzada por dichas moléculas fue responsable de la similitud observada en sus perfiles farmacocinéticos.

La comparación de la molécula IFN4N con las variantes 5N (IFN4NM47 e IFN3NM47/95, Fig. 64c) demostró que las últimas evidenciaron un perfil farmacocinético mejorado con respecto a IFN4N. Si bien no se hallaron diferencias significativas en el $t_{1/2}$, $T_{m\acute{a}x}$ y $C_{m\acute{a}x}$, en particular los parámetros CL_{app} y AUC evidenciaron notables diferencias ($p=0,0104$ y $p=0,009$ para IFN4NM47; $p=0,0128$ y $p=0,0102$ para IFN3NM47/95). Este resultado demostró la importancia de la glicosilación ya que permitió retardar la eliminación de la proteína de circulación.

En la Fig. 64d se compara la variante IFN4N con las muteínas 6N (IFN4NMutNter e IFN3N47MutNter). En este caso también se comprobó la contribución que el incremento del grado de glicosilación produce sobre las propiedades farmacocinéticas de las muteínas. Al comparar las variantes IFN4N e IFN3N47MutNter podemos concluir que determinados parámetros correspondientes a la variante modificada en el extremo N-terminal mostraron notables mejorías, duplicando aproximadamente los valores de $T_{m\acute{a}x}$ y AUC, incrementando la $C_{m\acute{a}x}$ 1,4 veces y reduciendo en un 50% el CL_{app} ($p=0,0427$; $p<0,0001$; $p=0,0048$; y $p=0,0007$, respectivamente). Asimismo, como se discutió con anterioridad, la variante IFN4NMutNter evidenció notables mejoras farmacocinéticas cuando se comparó con IFN4N (Fig. 64a). Al comparar las muteínas 6N entre sí, el IFN3N47MutNter demostró parámetros farmacocinéticos que mejoraron los correspondientes a IFN4NMutNter, a pesar de que esta

última presenta la misma cantidad de sitios potenciales para N-glicosilación. Específicamente, $C_{m\acute{a}x}$ y AUC fueron superiores y el CL_{app} disminuyó ($p=0,015$; $p=0,0007$ y $p=0,0017$, respectivamente).

La comparación de los perfiles farmacocinéticos de todas las muteínas se visualiza en la Fig. 64e. En general se observa que al incrementar el número de sitios potenciales para N-glicosilación, tales perfiles farmacocinéticos mejoraron ostensiblemente, resultando más atractivo el correspondiente al IFN3N47MutNter (naranja). La determinación de los parámetros permite concluir que las principales diferencias significativas se observaron a nivel de AUC y CL_{app} para las moléculas 5N y 6N con respecto a IFN4N, mientras para los restantes parámetros dependió de cada muteína en particular, dado que a nivel de la $C_{m\acute{a}x}$ y el $T_{m\acute{a}x}$ sólo se encontraron diferencias significativas entre la variante IFN3N47MutNter y el IFN4N.

Tabla XXI. Parámetros farmacocinéticos del IFNwt, IFNwtMutNter, IFN4N, IFN4NMutNter, IFN3NM47, IFN2NM47/95, IFN4NM47, IFN3NM47/95 e IFN3N47MutNter, luego de su inyección subcutánea en ratas.

Muestra	$C_{m\acute{a}x}$ (UI.ml ⁻¹)	$T_{m\acute{a}x}$ (h)	$t_{1/2}$ (h)	AUC (UI.h.ml ⁻¹)	CL_{app} (ml.h ⁻¹)
IFNwt	138 ± 21	2,1 ± 0,3	8,0 ± 0,4	1787 ± 165	113 ± 11
IFNwtMutNter	124 ± 29	5 ± 1	24 ± 4	3787 ± 652	54 ± 9
IFN4N	194 ± 17	7 ± 1	54 ± 6	11732 ± 1115	17 ± 2
IFN4NMutNter	208 ± 4	11 ± 1	57 ± 6	15186 ± 964	13 ± 1
IFN3NM47	180 ± 3	7 ± 1	45 ± 3	11127 ± 293	18 ± 1
IFN2NM47/95	217 ± 29	7 ± 1	53 ± 1	12713 ± 935	16 ± 1
IFN4NM47	201 ± 25	9 ± 1	59 ± 2	16982 ± 2319	12 ± 2
IFN3NM47/95	221 ± 15	9 ± 1	46 ± 6	15930 ± 1681	13 ± 1
IFN3N47MutNter	279 ± 30	12 ± 3	62 ± 13	21188 ± 525	9 ± 1

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

En general, tanto el incremento en la masa molecular aparente de las proteínas recombinantes como así también de su carga negativa, ambos causados por un aumento en su grado de glicosilación, se tradujeron en notables mejorías en las propiedades farmacocinéticas de las variantes producidas y, en particular, de la variante IFN3N47MutNter que demostró, estadísticamente, diferencias significativas en todos los parámetros farmacocinéticos estudiados. La acción de los glicanos en las propiedades farmacocinéticas de distintas proteínas ha sido demostrado con éxito por diversos autores, independientemente de la metodología empleada para la modificación de la proteína, ya sea la mutación puntual de aminoácidos o bien la fusión a péptidos. (Perlman y col., 2003; Weenen y col., 2004; Lee y col., 2006; Ceaglio y col., 2008).

2.12. Análisis de la actividad biológica *in vivo* del IFN3NM47, IFN4NM47 e IFN3N47MutNter

Teniendo en cuenta los objetivos planteados en esta tesis, se decidió la selección de una muteína representante de cada uno de los grupos propuestos para llevar a cabo los ensayos de AB antitumoral *in vivo*.

Considerando el grupo A, el IFN3NM47 evidenció propiedades similares al IFN4N en cuanto a grado de glicosilación y propiedades farmacocinéticas mientras que su ABE antiproliferativa fue aproximadamente 7 veces superior. Para el grupo B, el IFN4NM47 constituyó el mejor candidato al presentar superior grado de glicosilación y en consecuencia propiedades farmacocinéticas mejoradas, mientras que su ABE antiproliferativa fue similar a la correspondiente al IFN4N. Finalmente, el IFN3NM47MutNter evidenció características farmacocinéticas muy atractivas y una ABE antiproliferativa 3 veces mayor a la de la molécula empleada como referencia.

El tratamiento consistió en inyecciones subcutáneas semanales de 5 µg de cada muteína durante 5 semanas (5 dosis) a los animales de experimentación (sección 12 de M&M). Se incluyeron la molécula de referencia IFN4N y PBS que fue el vehículo empleado para la preparación de las muestras. La evaluación del crecimiento de los tumores fue realizada mediante la medición de las dimensiones de los mismos a diferentes tiempos luego de comenzado el tratamiento. La evolución del tamaño de los tumores en el tiempo se muestra en la Fig. 65.

El tratamiento con las diferentes muteínas permitió reducir la velocidad de crecimiento de los tumores, en comparación con la observada al utilizar la solución vehículo. A su vez, se evidenció un menor tamaño de tumor al emplear cualquiera de las nuevas muteínas en comparación con la molécula que dio origen a este estudio (IFN4N). Esta diferencia fue más notoria luego de la medición del tamaño de los tumores al alcanzar el último día del experimento.

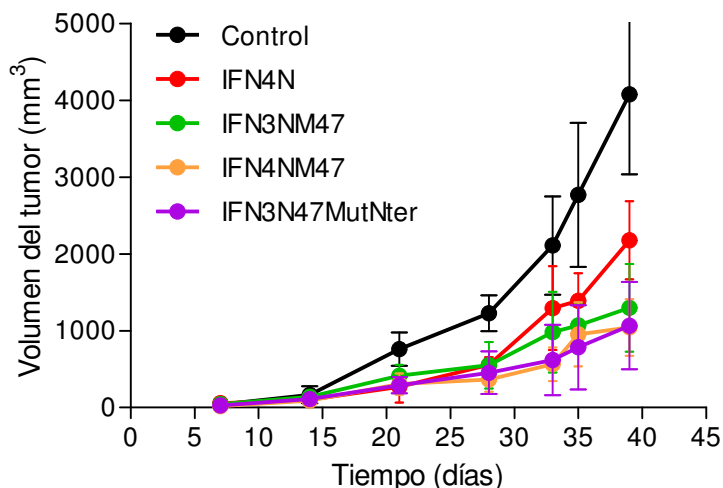


Fig. 65. Evaluación del efecto de las variantes hiperglicosiladas del hIFN- α 2b sobre el crecimiento de tumores de células PC-3 implantadas subcutáneamente en ratones *nude*. Análisis del volumen desarrollado por el tumor

La generación del modelo tumoral se realizó mediante inyección subcutánea de $2 \cdot 10^6$ células de la línea tumoral prostática PC-3. Dos días después se comenzó el tratamiento, que consistió en la inyección semanal de 5 μ g de IFN4N (●), IFN3NM47 (●), IFN4NM47 (●) e IFN3N47MutNterm (●). El grupo control (●) fue sometido a la inyección con PBS, que constituyó el vehículo de las moléculas anteriormente mencionadas. En el gráfico se muestra el volumen promedio del tumor en el eje de ordenadas en función del tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento, en el eje de abscisas. Los resultados se expresan como el valor promedio \pm SD ($n=6$).

Luego de 39 días de tratamiento, se realizó el sacrificio de los ratones, la extracción de los tumores y la determinación de su peso. La diferencia entre cada uno de los tratamientos y el control se analizó mediante la aplicación de test-t paramétrico, considerando la existencia de diferencias significativas cuando $p < 0,05$. Además, todas las muestras fueron evaluadas mediante ANOVA de una vía ($p < 0,05$) y una prueba posterior de comparación múltiple de Tukey ($p < 0,05$).

En la Fig. 66 se graficó el peso promedio de los tumores en función de los diferentes tratamientos. Se observó que todas las muteínas derivadas del hIFN- α 2b redujeron significativamente el peso del tumor en comparación con los tumores tratados con la solución vehículo ($p=0,0484$ para IFN4N; $p=0,0229$ para IFN3NM47; $p=0,0019$ para IFN4NM47 y $p=0,0011$ para IFN3N47MutNter). Además, se observó una tendencia de las nuevas muteínas hiperglicosiladas a disminuir el tamaño del tumor al finalizar el tratamiento respecto de lo observado para el IFN4N. Específicamente, las variantes más glicosiladas, 5N y 6N (IFN4NM47 e IFN3N47MutNter) podrían ser las más promisorias ya que difirieron ampliamente del control (vehículo), resultando más efectivas en forma significativa al compararlas con el IFN4N en relación al volumen tumoral ($p=0,0008$ y $p=0,0187$, respectivamente).

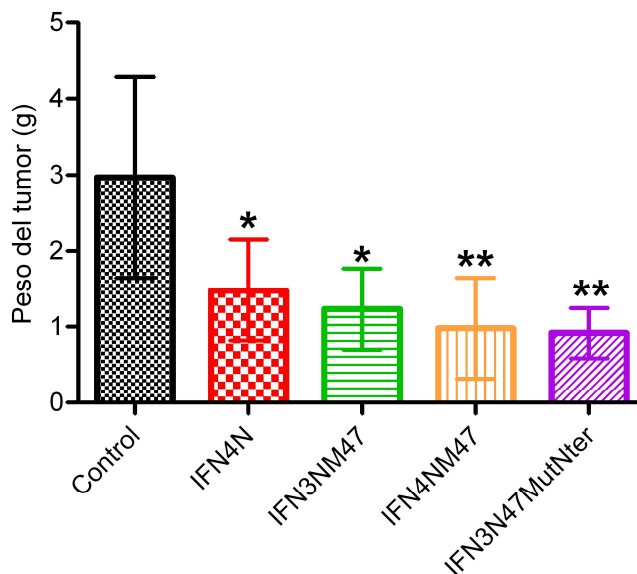


Fig. 66. Evaluación del efecto antitumoral de las variantes del hIFN- α 2b sobre el crecimiento de tumores de células PC-3 implantadas subcutáneamente en ratones *nude*. Análisis del peso de los tumores al final del experimento

A los 39 días de inyectada la primera dosis se realizó el sacrificio de los ratones, extracción de los tumores y determinación de su peso. En el gráfico se muestra el peso promedio de los tumores provenientes del tratado con la solución vehículo de las muteínas (●) con IFN4N (●), IFN3NM47 (●), IFN4NM47 (●) e IFN3N47MutNter (●). Los resultados se expresan como el valor promedio \pm SD (n=6). Los asteriscos indican la existencia de diferencias significativas con respecto al control (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Los tumores derivados de los diferentes tratamientos con muteínas evidenciaron menor tamaño, peso y, macroscópicamente, se observó un menor grado de vascularización (Fig. 67). Estas características fueron más notorias para los tumores derivados del tratamiento con IFN3N47MutNter.

A pesar de que no se observaron diferencias significativas para un $p < 0,05$ entre los tratamientos de las nuevas muteínas con relación a IFN4N, fue clara la tendencia de la disminución del peso y el tamaño luego de la restauración del residuo Arg23 o en forma concomitante al incremento de sitios de N-glicosilación. Bajo esta consideración, los experimentos serán reiterados extendiendo el tiempo de aplicación de los tratamientos, dado que consideramos que el periodo de análisis debería haber sido mayor. Es posible acceder a esta conclusión luego de observar que las diferencias más notables entre los tratamientos se observaron hacia el final del experimento, cuando se llevó a cabo la eutanasia de los animales.

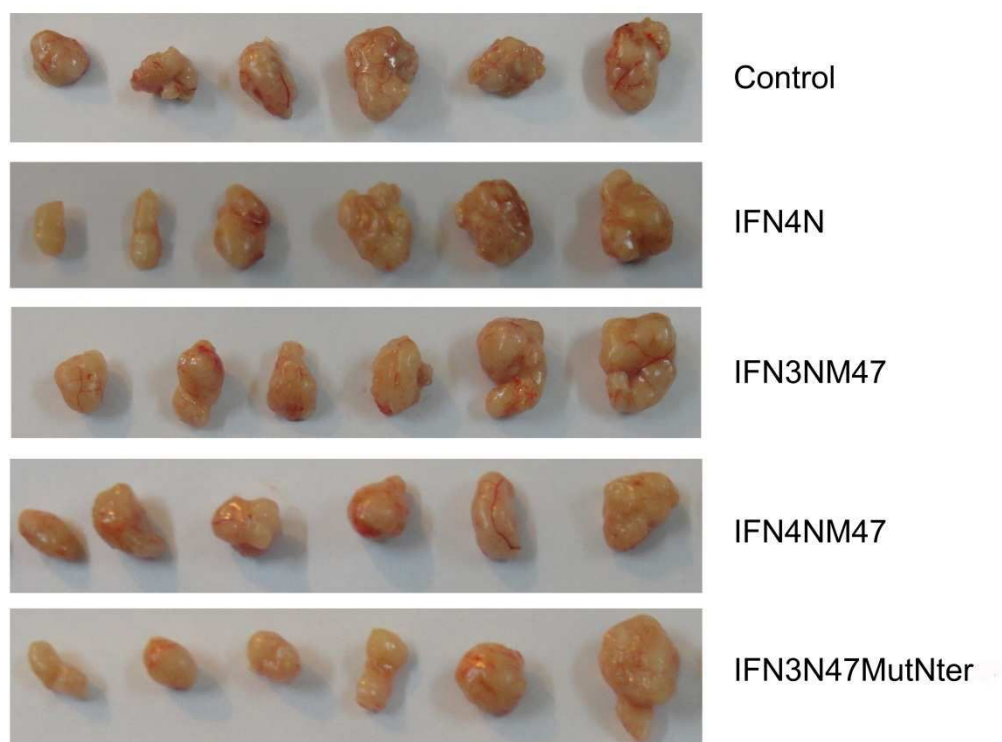


Fig. 67. Fotografía de los tumores generados en ratones *nude* inoculados con células PC-3 y sometidos al tratamiento con IFN4N, IFN3NM47, IFN4NM47 e IFN3N47MutNter

Asimismo, y como se mencionara en el primer capítulo, la velocidad de crecimiento del tumor aplicando el tratamiento con IFN4N producido en células CHO se puede dividir en una primera etapa de crecimiento lento ($22 \pm 5 \text{ mm}^3 \cdot \text{día}^{-1}$) y otra de crecimiento más acelerado ($143 \pm 15 \text{ mm}^3 \cdot \text{día}^{-1}$). En el caso de las muteínas IFN3NM47, IFN4NM47 e IFN3N47MutNter, se observó una única pendiente o velocidad de crecimiento lenta en todo momento durante el tratamiento (40 ± 4 , 32 ± 6 y $30 \pm 4 \text{ mm}^3 \cdot \text{día}^{-1}$, respectivamente) e inferior a la correspondiente a la segunda fase de crecimiento de los tumores tratados con IFN4N. Un comportamiento similar se observó durante el crecimiento de los tumores tratados con IFN4N producido en células HEK que evidenciaron en todo momento una velocidad de crecimiento lento de $22 \pm 5 \text{ mm}^3 \cdot \text{día}^{-1}$. Dado que el IFN4N_{HEK} demostró mayor AB antiproliferativa evaluada *in vitro*, el incremento de la ABE antiproliferativa alcanzada por la muteína IFN3NM47 con respecto a IFN4N podría ser responsable del enlentecimiento del crecimiento tumoral.

Es importante considerar, además, que el tratamiento con la variante IFN4NM47 (que preservó la ABE antiproliferativa del IFN4N pero incrementó la glicosilación y, en consecuencia, mejoró sus propiedades farmacocinéticas) también generó durante su aplicación un enlentecimiento del crecimiento tumoral. El mismo efecto fue observado

durante el tratamiento con IFN3N47MutNter que incluye en sí mismo un incremento de la ABE antiproliferativa y una mejora de las propiedades farmacocinéticas. Es decir que no se observó un efecto sinérgico por la incorporación de ambas cualidades en la molécula. Probablemente y considerando el período durante el cual se extendió el experimento, cualquiera de las modificaciones efectuadas sobre el IFN4N podrían conducir a una mejora del tratamiento. Sin embargo, extender el período del tratamiento en los experimentos *in vivo* resultaría muy útil para aportar precisiones con respecto a si optimizar la interacción con el receptor y, simultáneamente mejorar el tiempo de permanencia en circulación sanguínea podrían aportar mayor beneficio al enlentecimiento o detención del crecimiento tumoral, o bien, a su remisión.



CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

La producción de proteínas humanas recombinantes en sistemas procariotas o eucariotas simples se plantea como un procedimiento sencillo, rápido y de bajo costo; sin embargo, el empleo de sistemas eucariotas complejos como las células de mamíferos permite su obtención con características similares a la proteína nativa. Particularmente, la introducción de modificaciones postraduccionales apropiadas, especialmente la glicosilación, resulta muy relevante para el desempeño de las proteínas recombinantes de uso terapéutico (Badarnayake y Almo, 2014).

Las células CHO constituyen el sistema eucariota más empleado para la producción de diversas proteínas recombinantes con acción farmacológica. Presentan una larga historia de desarrollo y perfeccionamiento con una amplia lista de productos que han atravesado exitosamente instancias de evaluación, lográndose la aprobación de distintos agentes terapéuticos para humanos. Sin embargo, los productos derivados de este huésped no humano han demostrado la presencia de epitopes antigénicos, como el ácido glicolilneuramínico (Neu5Gc), capaces estimular la respuesta inmune y finalmente conducir al fracaso de la terapia (Durocher y Butler, 2009; Ghaderi, 2010; Almo y Love, 2014). Las células de origen humano, como las HEK, son capaces de producir proteínas recombinantes con características más similares a las proteínas secretadas naturalmente por humanos, evitando así la presencia de epitopes antigénicos. Estas células son muy eficientes para la producción de proteínas recombinantes y han permitido la obtención de bioterapéuticos con modificaciones postraduccionales esenciales para poder ejercer su función de manera eficiente (Dumont y col., 2015).

El hIFN- α 2b constituye una proteína terapéutica que aún es producida en un huésped procariota y que, si bien es ampliamente utilizada en salud humana, el principal problema que reviste su uso clínico es la rápida eliminación de la circulación sanguínea. Por ello, aprovechando la capacidad de las células de mamífero de producir proteínas conteniendo glicanos que aportan mejoras en sus propiedades farmacocinéticas, en nuestro laboratorio se desarrolló una variante hiperglicosilada del hIFN- α 2b denominada IFN4N. Esta proteína presentó cuatro sitios potenciales para N-glicosilación, introducidos en los aminoácidos 4, 23, 70 y 77 mediante estrategias de glicoingeniería. La molécula producida en células CHO demostró un marcado incremento de su masa molecular aparente y en su contenido de ácido siálico, lo cual condujo a la prolongación de su tiempo de vida media y a una disminución del *clearance* plasmático (Ceaglio y col. 2008). Las modificaciones introducidas condujeron a una reducción en la AB *in vitro* con respecto al hIFN- α 2b, afectando principalmente su actividad antiproliferativa debido a la sustitución R23N. Sin embargo, el IFN4N demostró una potencia antitumoral *in vivo* superior respecto del

hIFN- α 2b no glicosilado, ejerciendo una clara disminución en la velocidad de crecimiento de los tumores.

Teniendo en cuenta los antecedentes descriptos anteriormente, el presente trabajo de tesis se centró en el desarrollo de dos ejes centrales. El primero se basó en la optimización del proceso de *upstream* para la producción de IFN4N, considerando la metodología de generación de las líneas celulares y el huésped de producción. El segundo se relacionó con el mejoramiento de las propiedades del IFN4N, ya sea mediante incremento de su grado de glicosilación y, en consecuencia, de su farmacocinética y/o AB *in vitro*. Ambos temas confluyeron en un denominador común que fue el de mejorar la actividad biológica *in vivo* de la molécula con el objeto de destinarla al tratamiento de patologías de naturaleza tumoral.

Con ese objetivo se desarrollaron líneas y clones celulares recombinantes productores de IFN4N en células CHO y HEK empleando vectores lentivirales de tercera generación. Los mismos demostraron una mayor productividad con respecto al clon originalmente empleado para la producción de IFN4N (4N2F5), el cual había sido obtenido en forma previa en nuestro laboratorio mediante transfección. La producción y purificación del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} permitió alcanzar recuperaciones de la proteína superiores al 86% con una pureza del 98% y 92% respectivamente, niveles apropiados para proceder a instancias posteriores de caracterización.

El IFN4N_{CHO} presentó una masa molecular aparente superior con respecto a la observada para el IFN4N_{HEK} debido a diferencias en sus glicanos. Dichas variaciones se observaron notablemente en ensayos de IEF, demostrando el IFN4N_{CHO} una mayor proporción de glicofomas más ácidas que el IFN4N_{HEK}, cuyas glicofomas se hallaron uniformemente distribuidas a lo largo de todo el gradiente de pH. La cuantificación de Neu5Ac confirmó el resultado anterior ya que reveló un contenido 2 veces superior para la variante derivada de células CHO con respecto a la producida en HEK. Asimismo, como era de esperar, no se detectó la presencia de Neu5Gc en el IFN4N_{HEK}, demostrando así la potencialidad del empleo de células humanas para producir proteínas carentes de tales determinantes antigénicos.

El análisis de los glicanos evidenció mayor proporción de entidades bi-, tri-, y tetrasialiladas para el IFN4N_{CHO}, mientras que para el IFN4N_{HEK} predominaron las estructuras neutras y monosialiladas. El estudio de las estructuras de N-glicanos digeridas con exoglicosidasas e identificadas mediante espectrometría de masas indicó una mayor abundancia de estructuras completas, más ramificadas, altamente sialiladas y con extensiones LacNAc (del tipo FA2G2S2, FA3G3S3, FA4G4S4 y FA4G4Lac1S4) para el IFN4N_{CHO}, mientras que para el IFN4N_{HEK} se observaron glicanos incompletos, de menor antenaricidad y trancos del tipo FA2B/FA3, FA2G1 y FA2BG1. Además, se pudo detectar la

presencia de estructuras conteniendo GlcNAc bisectante (*repeats*) sólo en los glicanos provenientes del IFN4N_{HEK}. Es muy importante tener en cuenta esta diferencia dada la relevancia que presenta esta estructura para la funcionalidad de distintas glicoproteínas humanas (Takahashi y col., 2009). Asimismo, las diferencias en el grado de glicosilación favorecieron la estabilidad térmica del IFN4N_{CHO} que conservó su AB hasta los 65°C, mientras que a esta temperatura el IFN4N_{HEK} conservó sólo un 70% de la misma, lo que se traduce en una mayor estabilidad conferida por los glicanos a la glicoproteína producida en células CHO.

Las diferencias observadas en el grado de glicosilación del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} no generaron grandes modificaciones en sus perfiles farmacocinéticos. Sólo se visualizaron diferencias significativas durante la fase de absorción, no así en los parámetros $t_{1/2}$, AUC y CL_{app} , por lo que fue posible concluir en la existencia de un importante grado de similitud en la farmacocinética de ambas moléculas.

La evaluación de la AB *in vitro* demostró la ausencia de diferencias significativas en la acción antiviral del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK} mientras que la variante obtenida en células humanas evidenció una capacidad antiproliferativa 2 veces superior respecto de la citoquina derivada de células de hámster. Por un lado, este resultado no es sorprendente si consideramos que se requiere una mayor afinidad entre el IFN y su receptor para desencadenar la actividad antiproliferativa, mientras que la acción antiviral puede desarrollarse aun cuando dicha interacción es más débil. Por otro lado, el mayor grado de glicosilación del IFN4N_{CHO}, particularmente su mayor contenido de ácido siálico, podría explicar su menor ABE antiproliferativa causada por la existencia de un fenómeno de repulsión entre las cargas negativas de la molécula y su receptor.

Considerando la acción que la glicosilación del IFN4N producido en diferentes huéspedes ejerció a nivel de la interacción con su receptor y a nivel de la farmacocinética, se evaluó la acción conjunta de ambos efectos sobre la actividad biológica antitumoral *in vivo*. El IFN4N_{HEK} no sólo fue capaz de disminuir la velocidad de crecimiento de los tumores durante el tratamiento, sino que también demostró, al final del tratamiento, un peso de tumor significativamente inferior con respecto a la solución vehículo usada como control y al IFN4N_{CHO}. Estos resultados demostraron que, aunque los glicanos producidos por las células HEK no produjeron importantes modificaciones en las propiedades farmacocinéticas de la molécula, fueron capaces de conferir una mayor conservación de AB *in vitro* que probablemente fue responsable de una mayor potencia antitumoral *in vivo*.

El segundo eje de esta tesis se basó en optimizar las propiedades de la molécula hiperglicosilada IFN4N. Con ese fin se diseñaron y produjeron grupos de muteínas derivadas de la misma con 3 objetivos: el primero, mejorar su AB antiproliferativa *in vitro* manteniendo su grado de glicosilación; el segundo, incrementar el grado de glicosilación de

la muteína de referencia para mejorar sus parámetros farmacocinéticos; y el tercero, mejorar ambas propiedades: farmacocinética (incrementando el grado de glicosilación) y AB antiproliferativa *in vitro*. De este modo, mediante estrategias de mutagénesis sitio-dirigida sobre los aminoácidos F47 y L95 y de mutagénesis por simple inserción para la fusión del péptido ANITVNITV al extremo N-terminal de la proteína, se obtuvieron muteínas con similar grado de glicosilación y superior ABE respecto del IFN4N (IFN3NM47, IFN3NM95, IFN2NM47/95 e IFN2NMutNter), moléculas con un mayor contenido de glicanos (IFN4NM47, IFN4NM95 e IFN4NMutNter) y variantes con ambas propiedades mejoradas (IFN3NM47/95, IFN3NMutNter e IFN3N47MutNter).

La evaluación de las características fisicoquímicas y biológicas *in vitro* de las muteínas a partir de líneas de células CHO que expresaron transitoriamente tales muteínas, permitió seleccionar las dos mejores variantes de cada grupo: IFN3NM47, IFN2NM47/95, IFN4NM47, IFN4NMutNter, IFN3NM47/95 e IFN3N47MutNter. A partir de la generación de líneas celulares estables y del clonado correspondiente, las muteínas fueron producidas y purificadas obteniéndose recuperaciones superiores al 83% y porcentajes de pureza elevados. Estos resultados confirmaron la utilidad de la CIA como único paso de purificación para la obtención de muteínas que presentaron diferentes propiedades fisicoquímicas.

La utilidad de las estrategias de glicoingeniería para incrementar el contenido de N-glicanos fue confirmada por el aumento de la masa molecular aparente del IFN y también del número y proporción de isoformas ácidas, a medida que se incrementó el número de modificaciones introducidas. Asimismo, se evidenció un aumento en el contenido de Neu5Ac conforme se incrementó el número de sitios potenciales para N-glicosilación. Las variantes 4N (IFN2NM47/95 e IFN3NM47) no evidenciaron diferencias significativas en el contenido de Neu5Ac con respecto la molécula de referencia IFN4N, mientras que las muteínas 5N (IFN3NM47/95 e IFN4NM47) demostraron un notable incremento, al igual que el IFN3N47MutNter. Sólo el IFN4NMutNter evidenció un contenido de Neu5Ac inferior al esperado, lo cual podría estar indicando cierta influencia del entorno proteico y del arreglo de los glúcidos en la incorporación del mismo. A su vez, el incremento del contenido de Neu5Ac fue acompañado por la presencia de una mayor proporción de Neu5Gc. Este glicano, de características inmunogénicas, debería ser controlado en el producto final para evitar la generación de respuesta inmune.

La caracterización biológica *in vitro* de las muteínas evidenció una notable disminución de la ABE de las mismas frente a la introducción de modificaciones puntuales ya sea en la secuencia de la molécula o en su extremo N-terminal. En general, las modificaciones realizadas afectaron en mayor medida la capacidad antiproliferativa del IFN respecto de su actividad antiviral. No sólo la mutación R23N, sino también la modificación L95T, demostraron tener un papel protagónico en la disminución de la ABE antiproliferativa

del IFN. La introducción del péptido ANITVNITV en el extremo N-terminal de las moléculas en estudio también produjo disminución en su ABE antiviral y antiproliferativa. Un aspecto muy relevante en este trabajo fue que la restauración del residuo R23 en la secuencia del IFN condujo a una mejora notable de la ABE antiproliferativa en aquellas variantes con un grado similar o superior de N-glicosilación. Asimismo, es posible concluir que el diseño de los grupos de muteínas, destinado a cumplir determinados niveles de ABE antiproliferativa con respecto a la muteína original IFN4N, fue concretado con éxito. Sólo el IFN4NMutNter evidenció un valor de ABE antiproliferativa superior respecto del IFN4N, mientras se esperaba un descenso de la misma. Esto podría deberse a arreglos conformacionales dados por la particular combinación de las modificaciones introducidas.

El estudio de las propiedades farmacocinéticas de las nuevas muteínas confirmó que el incremento del grado de glicosilación del IFN fue responsable de la notable disminución del CL_{app} y del incremento significativo del AUC. A su vez, la mejora de las propiedades farmacocinéticas se encontró estrechamente relacionada al aumento en el contenido de ácido siálico. Específicamente, las variantes 5N (IFN4NM47, IFN3NM47/95) y 6N (IFN3N47MutNter) evidenciaron el mayor contenido de ácido siálico y, en forma concomitante, el mejor comportamiento farmacocinético. Además, aquellas muteínas con 4 sitios potenciales para N-glicosilación (IFN3NM47 e IFN2NM47/95) presentaron perfiles farmacocinéticos muy similares al observado para el IFN4N.

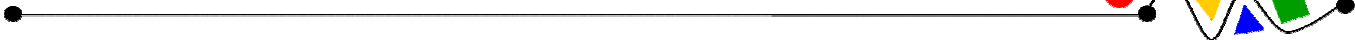
Del mismo modo al llevado a cabo en el primer capítulo de este trabajo, la influencia del incremento de la ABE y de la farmacocinética de las muteínas fue conjuntamente evaluada a nivel de la AB *in vivo* de tales moléculas. A partir de la caracterización fisicoquímica y biológica, así como también de los resultados de farmacocinética, se seleccionó el mejor representante de cada grupo para proceder a la evaluación de la actividad antitumoral *in vivo*, siendo las variantes elegidas IFN3NM47, IFN4NM47 e IFN3N47MutNter. La realización de estos experimentos permitió concluir que el incremento de la glicosilación para mejorar las propiedades farmacocinéticas de IFN, por un lado, o la restauración del aminoácido R23, que condujo al aumento de la ABE antiproliferativa evaluada *in vitro*, por el otro, fueron modificaciones útiles para aumentar la acción antitumoral *in vivo* de la proteína. Sin embargo, el incremento simultáneo de la ABE y de la glicosilación en la misma molécula no se tradujo en un efecto sinérgico durante el período de estudio. Es por ello que la continuidad del presente trabajo se centra en el incremento del tiempo de tratamiento de los animales con la muteína IFN3N47MutNter para concluir si optimizar la interacción con el receptor y, simultáneamente, mejorar la farmacocinética de la molécula original podría aportar mayor beneficio a la terapia antitumoral. Además, extender el tiempo de la terapia en animales de experimentación con la muteína IFN3N47MutNter permitiría observar diferencias que no pudieron visualizarse durante el ensayo a corto

término, tales como determinar si la etapa de crecimiento rápido se halla retrasada o si comienza una etapa de remisión, o bien si el crecimiento se enlentece y se llega a una fase estacionaria donde podría resultar útil el tratamiento con fármacos de otra naturaleza.

Finalmente, el objetivo de obtener moléculas derivadas de hIFN- α 2b con mayor eficacia fue logrado con éxito a partir de cualquiera de las dos opciones de modificaciones propuestas: incremento del contenido de glicanos o restauración del residuo de R23. Asimismo, la evaluación del huésped de producción para la muteína original IFN4N permitió mejorar la AB antiproliferativa analizada *in vitro* de una manera similar a la restauración del residuo R23 antes mencionado. Por lo tanto, el empleo de células HEK presentó un gran impacto en las características glicosídicas de la molécula que evidentemente modificaron su capacidad de interacción con el receptor específico y su modo de acción *in vivo*. Estas evidencias revelan la potencialidad de la combinación de ambas estrategias para la generación de nuevos agentes terapéuticos hiperglicosilados.

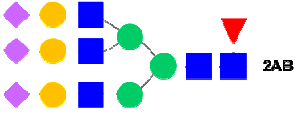
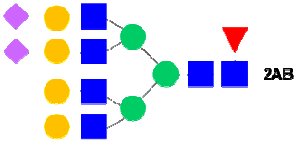
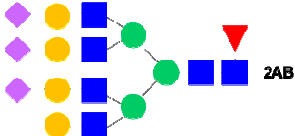
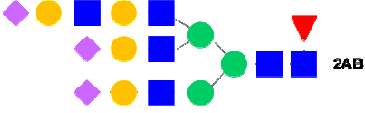
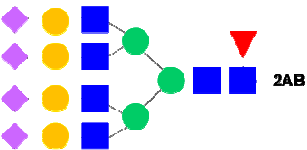
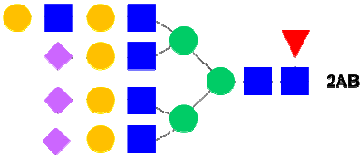
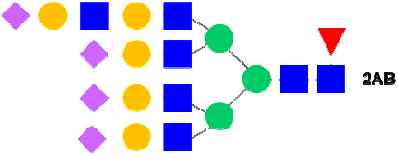
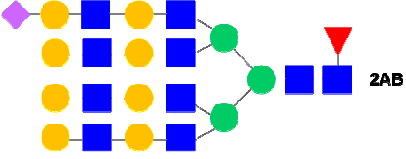
En términos generales, el proceso de generación de un nuevo terapéutico hiperglicosilado es altamente complejo. Por lo tanto, para un biofármaco derivado de hIFN- α 2b con tales características, la búsqueda de un balance apropiado entre la AB *in vitro* y las propiedades farmacocinéticas en el contexto del huésped de producción adecuado, constituyen las claves para la obtención de un producto innovador y efectivo.

ANEXO

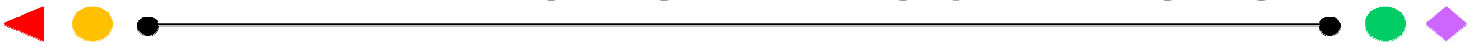


ANEXO**Representación gráfica de las estructuras de los N-glicanos derivados del IFN4N_{CHO} e IFN4N_{HEK}****Nomenclatura:**

Nombre de la estructura	Representación gráfica	m/z teórico
A2		1436,476
FA2		1582,534
FA2G1		1744,587
FA2B		1785,613
FA3		1785,613
FA2BG1		1947,666
FA2G2S1		2197,735
FA2G2S2		2488,910
FA3G3S2		2853,963

Nombre de la estructura	Representación gráfica	m/z teórico
FA3G3S3		3145,058
FA4G4S2		3219,095
FA4G4S3		3510,190
FA3G3Lac1S3		3510,190
FA4G4S4		3801,286
FA4G4Lac1S3		3875,322
FA4G4Lac1S4		4166,418
FA4G4Lac4S1		4411,600

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adolf, G.R.; Kalsner, I.; Ahorn, H.; Maurer-Fogy, I. y Cantell, K. (1991) *Natural human interferon- α 2 is O-glycosylated*. *Biochem.J.* 276:511-518.

Almo, S.C. y Love, J.D. (2014) *Better and faster: improvements and optimization for mammalian recombinant protein production*. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 26:39-43.

Amet, N.; Wang, W. y Shen, W.C. (2010) *Human growth hormone-transferrin fusion protein for oral delivery in hypophysectomized rats*. *J. Control Release.* 141(2):177-182.

Baenziger, J.U. (1996) *Glycosylation: to what end for the glycoprotein hormones?* *Endocrinology.* 137(5):1520-1522.

Bai, Y.; Ann, D.K. y Shen, W.C. (2005) *Recombinant granulocyte colonystimulating factor-transferrin fusion protein as an oral myelopoietic agent*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 20:7292-7296.

Bailon, P. y Berthold, W. (1998) *Polyethylene glycol-conjugated pharmaceutical proteins*. *Pharm. Sci. Technol. Today.* 1(8):352-356.

Bailon, P.; Palleroni, A.; Schaffer, C.A.; Spence, C.L.; Fung, W.J.; Porter, J.E.; Ehrlich, G.K.; Pan, W.; Xu, Z.X.; Modi, M.W.; Farid, A.; Berthold, W. y Graves, M. (2001) *Rational design of a potent, long lasting form of interferon: a 40 kDa branched poly-ethylene glycolconjugated interferon alpha-2a for the treatment of hepatitis C*. *Bioconjug. Chem.* 12:195-202.

Baldi, L.; Hacker, D.L.; Adam, M. y Wurm, F. M. (2007) *Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives*. *Biotechnol Lett.* 29:677-684.

Bandaranayake, A.D. y Almo, S.C. (2014) *Recent advances in mammalian protein production*. *FEBS Lett.* 588:253-260.

Baranyi, L.; Doering, C. B.; Denning, G.; Gautney, R. E.; Harris, K. T.; Spencer, H. T.; Roy, A.; Zayed, H. y Dropulic, B. (2013) *Rapid generation of stable cell lines expressing high levels of erythropoietin, factor VIII, and an antihuman CD20 antibody using lentiviral vectors*. *Hum. Gene Ther. Methods.* 24:214-227.

Barral, P.M.; Sarkar, D.; Su, Z.Z.; Barber, G.N.; DeSalle, R.; Racaniello, V.R. y Fisher, P.B. (2009) *Functions of the cytoplasmic RNA sensors RIG-I and MDA-5: key regulators of innate immunity*. *Pharmacol. Ther.* 124:219-234.

Beals, J. M. y Shanafelt, A. B. (2006) *Enhancing exposure of protein therapeutics*. *Drug Discov. Today.* 3(1):87-94.

Bekisz, J.; Schmeisser, H.; Hernandez, J.; Goldman, N.D. y Zoon, K.C. (2004). *Human Interferons Alpha, Beta and Omega*. *Growth Factors.* 22(4):243-251.

Belardelli, F.; Ferrantini, M.; Proietti, E. y Kirkwood, J.M. (2002) *Interferon-alpha in tumor immunity and immunotherapy*. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13:119-134.

Billiau, A. (2006) *Interferon: the pathways of discovery I. Molecular and cellular aspects*. *Cytokine Growth Factor Rev.* 17:381-409.

- Bino, T.; Madar, Z.; Gertler, A.; Rosenberg, H. (1982) *The kidney is the main site of interferon degradation*. J. Interferon Res. 2 (29): 301-308.
- Birch, J. R.; Mainwaring, D. O. y Racher, A. J. (2005) *Use of the glutamine synthetase (GS) expression system for the rapid development of highly productive mammalian cell processes*. En: *Modern Biopharmaceuticals*. (Ed: Knablein, J.) Wiley-VCH Verlag GmbH y Co. KGaA, Weinheim, Alemania. p. 809–832.
- Blatt, L.M.; Davis, J.M.; Klein, S.B. y Taylor, M.W. (1996) *The biologic activity and molecular characterization of a novel synthetic interferon-alpha species, consensus interferon*. J. Interferon Cytokine Res. 16(7):489-499.
- Bloom, J.W.; Madanat, M.S. y Ray, M.K. (1996) *Cell line and site specific comparative analysis of the N-linked oligosaccharides on human ICAM-1des454-532 by electrospray ionization mass spectrometry*. Biochemistry 35:1856-1864.
- Bocci, V.; Carraro, F.; Naldini, A.; Cagol, P.P.; Pasqual, E.M.; Prevaldi, C. y Casara, D. (1990) *Distribution of human recombinant interferon-alpha 2 in rat plasma, liver, and experimental liver metastases*. Mol. Biother. 2:233-234.
- Bohm, E.; Seyfried, B.K.; Dockal, M.; Graninger, M.; Hasslacher, M.; Neurath, M.; Konetschny, C.; Matthiessen, P.; Mitterer, A. y Scheifflinger, F. (2015) *Differences in N-glycosylation of recombinant human coagulation factor VII derived from BHK, CHO, and HEK293 cells*. BMC Biotechnol. 15:87.
- Borden, E.C.; Sen, G.C.; Uze, G.; Silverman, R.H.; Ransohoff, R.M.; Foster, G.R. y Stark G.R. (2007) *Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine*. Nat. Rev. Drug Discov. 6:975-990.
- Bosques, C.J.; Collins, B.E.; Meador, J.W.; Sarvaiya, H.; Murphy, J.L.; Dellorusso, G.; Bulik, D.A.; Hsu, I.-H.; Washburn, N.; Sipsey, S.F.; Myette, J.R.; Raman, R.; Shriver, Z.; Sasisekharan, R. y Venkataraman, G. (2010) *Chinese hamster ovary cells can produce galactose- α -1,3-galactose antigens on proteins*. Nat. Biotechnol. 28:1153–1156.
- Brooks, S.A. (2004) *Appropriate glycosylation of recombinant proteins for human use: implications of choice of expression system*. Mol. Biotechnol. 28:241-255.
- Büssow, K. (2015) *Stable mammalian producer cell lines for structural biology*. Curr. Opin. Struct. Biol. 32:81–90.
- Butler, M. (2004). *Animal cell culture and technology*. (Ed.: Butler, M.) BIOS Scientific Publishers, Oxford, Reino Unido. p. 1-125.
- Butler, M. (2005) *Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 68:283–291.
- Butler, M. y Spearman, M. (2014) *The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering*. Curr. Opin. Biotechnol. 30:107-112.
- Butler, M.; Quelhas, D.; Critchley, A.J.; Carchon, H.; Hebestreit, H.F.; Hibbert, R.G.; Vilarinho, L.; Teles, E.; Matthijs, G.; Schollen, E.; Argibay, P.; Harvey, D.J.; Dwek, R.A.; Jaeken, J. y Rudd, P.M. (2003). *Detailed glycan analysis of serum glycoproteins of patients with congenital disorders of glycosylation indicates the specific defective glycan processing step and provides an insight into pathogenesis*. Glycobiology. 13:601-622.
- Capon, D.J.; Chamow, S.M.; Mordenti, J.; Marsters, S.A.; Gregory, T.; Mitsuya, H.; Byrn, R.A.; Lucas, C.; Wurm, F.M. y Groopman, J.E. (1989) *Designing CD4 immunoadhesins for AIDS therapy*. Nature. 337:525–531.

- Capone, M.V.; Suzuki, M.F.; Oliveira, J.E.; Damiani, R.; Soares, C.R. y Bartolini, P. (2015). *N-glycoprofiling analysis in a simple glycoprotein model: a comparison between recombinant and pituitary glycosylated human prolactin*. J. Biotechnol. 202:78-87.
- Carbone, C. y Maschi, F. (2006) *El ratón nude (nu/nu) como modelo animal de inmunodeficiencia*. Qviva 5. (1):19-23.
- Carter, P.J. (2011) *Introduction to current and future protein therapeutics: a protein engineering perspective*. Exp. Cell Res. 317:1261-1269.
- Casalis, P. (2004) Tesina de Licenciatura en Biotecnología: *Obtención y caracterización de un panel de anticuerpos monoclonales anti-interferón alfa 2b humano recombinante (rhIFN- α 2b)*. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL. Santa Fe, Argentina.
- Ceaglio, N., Etcheverrigaray, M., Kratje, R. y Oggero, M. (2008) *Novel long-lasting interferon alpha derivatives designed by glycoengineering*. Biochimie. 90:437-449.
- Ceaglio, N.; Etcheverrigaray, M.; Conradt, H.S.; Grammel, N.; Kratje, R. y Oggero, M. (2010a) *Highly glycosylated human alpha interferon: An insight into a new therapeutic candidate*. J. Biotechnol. 146:74-83.
- Ceaglio, N.; Gugliotta, A.; Tardivo, M.B.; Cravero, D.; Etcheverrigaray, M.; Kratje, R. y Oggero, M. (2016) *Improvement of in vitro stability and pharmacokinetics of hIFN- α by fusing the carboxyl-terminal peptide of hCG β -subunit*. J. Biotechnol. 221:13-24.
- Ceaglio, N. (2008) Tesis Doctoral: *Desarrollo de una tecnología de producción de IFN- α humano recombinante glicosilado en células eucariontes*. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL, Santa Fe, Argentina.
- Chen, X.; Zaro, J. y Shen, A.C. (2013) *Fusion protein linkers: effects on production, bioactivity, and pharmacokinetics*. En: *Fusion protein technologies for biopharmaceuticals: applications and challenges*. (Ed.: Schmidt, S.R.) Wiley, Hoboken, Nueva Jersey, EE.UU. p.122–149.
- Chuntharapai, A.; Gibbs, V.; Lu, J.; Ow, A.; Marsters, S.; Ashkenazi, A.; De Vos, A.; Jin Kim, K. (1999) *Determination of residues involved in ligand binding and signal transmission in the human IFN- α receptor 2*. J. Immunol. 163:766-773.
- Cockrell, A. S. y Kafri, T. (2007) *Gene delivery by lentivirus vectors*. Mol. Biotechnol. 36(3): 184-204.
- Content, J. (2009) *Mechanisms of induction and action of interferons*. Verh. K. Acad. Geneesk. Belg.71:51-71.
- Cook, J.; Mitchell, J. (1989) *Viability measurements in mammalian systems*. Anal. Biochem. 179: 1-7.
- Cosby, N. y Lesley, S. (1997) *Site-directed mutagenesis*. Promega Notes Magazine. 61:12-18.
- Costa, A.R.; Rodrigues, M.E.; Henriques, M.; Oliveira, R. y Azeredo, J. (2014) *Glycosylation: impact, control and improvement during therapeutic protein production*. Crit Rev Biotechnol. 34(4):281-299.
- Croset, A.; Delafosse, L.; Gaudry, J.P.; Arod, C.; Glez, L.; Losberger, C.; Begue, D.; Krstanovic, A.; Robert, F.; Vilbois, F.; Chevalet, L. y Antonsson, B. (2012) *Differences in the glycosylation of recombinant proteins expressed in HEK and CHO cells*. J. Biotechnol. 161:336-348.

- Cuatrecasas, P.; Wilchek, M.; Anfinsen, C. (1968) *Selective enzyme purification by affinity chromatography*. *Biochemistry*. 61:636-643.
- Cumming, D.A. (1991) *Glycosylation of recombinant protein therapeutics: control and functional implications*. *Glycobiology*. 1(2):115-130.
- Czajkowsky, D.M.; Hu, J.; Shao, Z. y Pleass, R.J. (2012) *Fc-fusion proteins: new developments and future perspectives*. *EMBO Mol. Med.* 4:1015–1028.
- Depetris, M. (2008) Tesis doctoral: *Obtención de anticuerpos recombinantes anti-IFN- α 2b destinados a uso terapéutico humano*. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL. Santa Fe, Argentina.
- Diaz, S. L.; Padler-Karavani, V.; Ghaderi, D.; Hurtado-Ziola, N.; Yu, H.; Chen, X.; Brinkman-Van der Linden, E. C.; Varki, A. y Varki, N. M. (2009) *Sensitive and specific detection of the non-human sialic Acid N-glycolylneuraminic acid in human tissues and biotherapeutic products*. *PLoS ONE*. 4:e4241.
- Dicker, M. y Strasser, R. (2015) *Using glyco-engineering to produce therapeutic proteins*. *Expert Opin. Biol. Ther.* 15(10):1501-1516.
- Dropulic, B. (2011) *Lentiviral Vectors: Their Molecular Design, Safety, and Use in Laboratory and Preclinical Research*. *Hum. Gene Ther.* 22:649–657
- Dull, T.; Zufferey, R.; Kelly, M.; Mandel, R. J.; Nguyen, M.; Trono, D. y Naldini, L. (1998) *A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system*. *J. Virol.* 72:8463–8471.
- Dumont, J.; Ewart, D.; Mei, B.; Estes, S. y Kshirsagar, R. (2015) *Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives*. *Crit. Rev. Biotechnol.* 18:1-13
- Durocher, Y. y Butler, M (2009) *Expression systems for therapeutic glycoprotein production*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20:700–707
- Egrie, J.C. y Browne, J.K. (2001). *Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP)*. *Nephrol. Dial. Transplant.* 16(3):3-13.
- El-Baky, N.A y Redwan, E.M. (2015) *Therapeutic Alpha-Interferons Protein: Structure, Production, and Biosimilar*. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 45(2):109-127.
- Elliott, S.; Lorenzini, T.; Asher, S.; Aoki, K.; Brankow, D.; Buck, L.; Busse, L.; Chang, D.; Fuller, J.; Grant, J.; Hernday, N.; Hokum, M.; Hu, S.; Knudten, A.; Levin, N.; Komorowski, R.; Martin, F.; Navarro, R.; Osslund, T.; Rogers, G.; Rogers, N.; Trail, G. y Egrie, J. (2003) *Enhancement of therapeutic protein in vivo activities through glycoengineering*. *Nat. Biotechnol.* 21(4):414-421.
- Escarpe, P.; Zayek, N.; Chin, P.; Borellini, F.; Zufferey, R.; Veres, G. y Kiermer, V. (2003) *Development of a sensitive assay for detection of replication-competent recombinant lentivirus in large-scale HIV-based vector preparations*. *Mol. Ther.* 8:332–341
- Estes, S. y Melville, M. (2014). *Mammalian cell line developments in speed and efficiency*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 139:11–33.
- Fares, F.; Ganem, S.; Hajouj, T. y Agai, E. (2007) *Development of long-acting erythropoietin by fusing the carboxy-terminal peptide of human chorionic gonadotropin beta-subunit to the coding sequence of human erythropoietin*. *Endocrinology*. 148:5081–5087.

Fares, F.; Guy, R.; Bar-Ilan, A.; Felikman, Y. y Fima, E. (2010) *Designing a long-acting human growth hormone (hGH) by fusing the carboxyl-terminal peptide of human chorionic gonadotropin beta-subunit to the coding sequence of hGH*. *Endocrinology*. 151(9):4410-4417.

Fares, F.; Havron, A. y Fima, E. (2011) *Designing a Long Acting Erythropoietin by Fusing Three Carboxyl-Terminal Peptides of Human Chorionic Gonadotropin β Subunit to the N-Terminal and C-Terminal Coding Sequence*. *Int. J. Cell Biol.* 2011:275063

Felgner, P.; Gadek, T.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H.W.; Wenz, M.; Northrop, J.P.; Ringold, G.M. y Danielsen, M. (1987) *Lipofection: a highly efficient, lipid mediated DNA transfection procedure*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7417.

Fliedl, L.; Grillari, J. y Grillari-Voglauer, R. (2015) *Human cell lines for the production of recombinant proteins: on the horizon*. *New Biotech.* 32(6):673-678.

Freshney, R. (2000a) *Cell lines*. En: *Culture of animal cells. A manual of basic technique*. Wiley-Liss Inc, New Jersey, EE.UU., cap. 12, p. 177-193.

Freshney, R. (2000b) *Cryopreservation*. En: *Culture of animal cells. A manual of basic technique*. Wiley-Liss Inc, New Jersey, EE.UU., cap. 16, p. 297-308.

Freshney, R. (2000c) *Cloning and selection*. En: *Culture of animal cells. A manual of basic technique*. Wiley-Liss Inc, New Jersey, EE.UU., cap. 13, p. 195-213.

Friesen, H.J.; Stein, S.; Evinger, M.; Familletti, P. C.; Moschera, J.; Meienhofer, J.; Shively, J. y Pestka, S. (1981) *Purification and molecular characterization of human fibroblast interferon*. *Arch. Biochem. Biophys.* 206(2):432-450.

Fuertes, M.B.; Woo, S.R.; Burnett, B.; Fu, Y.X y Gajewski, T.F (2013). *Type I IFN response and innate immune sensing of cancer*. *Trends Immunol.* 34(2):67-73.

Gaudry, J.P.; Arod, C.; Sauvage, C.; Busso, S.; Dupraz, P.; Pankiewicz, R. y Antonsson, B. (2008) *Purification of the extracellular domain of the membrane protein GlialCAM expressed in HEK and CHO cells and comparison of the glycosylation*. *Protein Expr. Purif.* 58:94-102.

Geisse, S. (2009) *Reflections on more than 10 years of TGE approaches*. *Protein Expr. Purif.* 64:99-107.

Geisse, S. y Fux, C. (2009) *Recombinant Protein Production by Transient Gene Transfer into Mammalian Cells*. *Methods in Enzymology*. 463:223-238.

George, P.M.; Badiger, R.; Alazawi, W.; Foster, G.R. y Mitchell, J.A. (2012) *Pharmacology and therapeutic potential of interferons*. *Pharmacol. Ther.* 135:44-53.

Gershwin, M.E.; Ikeda, R.M.; Kawakami, T.G. y Owens, R.B. (1977) *Immunobiology of heterotransplanted human tumors in nude mice*. *J. Natl. Cancer Inst.* 58:1455-1463.

Ghaderi, D.; Taylor, R.E.; Padler-Karavani, V.; Diaz, S. y Varki, A. (2010) *Implications of the presence of N-glycolylneuraminic acid in recombinant therapeutic glycoproteins*. *Nat. Biotechnol.* 28(8):863-867.

Ghaderi, D.; Zhang, M.; Hurtado-Ziola, N. y Varki, A. (2012) *Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation*. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 28:147-175.

- Ghislain, J.; Sussman, G.; Goelz, S.; Ling, L.E. y Fish, E.N. (1995) *Configuration of the interferon alpha/beta receptor complex determines the context of the biological response*. J. Biol. Chem. 270:21785-21792.
- Giard, D.J.; Aaronson, S.A.; Todaro, G.J.; Arnstein, P.; Kersey, J.H.; Dosik, H. y Parks, W.P. (1973). *In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors*. J. Natl. Cancer Inst. 51:1417-1423.
- Gibaldi, M. y Perrier, D. (1982) *Method of residuals*. En: *Pharmacokinetics*, 2nd Edition. (Eds.: Gibaldi, M., Perrier, D.). Marcel Dekker, Inc., New York, EE.UU., apéndice C, p. 433-444.
- Go, E.P.; Liao, H.X.; Alam, S.M.; Hua, D.; Haynes, B.F. y Desaire, H. (2013) *Characterization of host-cell line specific glycosylation profiles of early transmitted/founder HIV-1 gp120 envelope proteins*. J. Proteome Res. 12:1223-1234.
- Goochee, C.F.; Gramer, M.J.; Andersen, D.C.; Bahr, J.B. y Rasmussen, J.R. (1992) *The oligosaccharides of glycoproteins: factors affecting their synthesis and their influence on glycoprotein properties*. Biotechnology. 9:1347-1355.
- Goodbourn, S.; Didcock, L. y Randall, R.E. (2000) *Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures*. J. Gen. Virol. 81:2341-2364.
- Gorman, C. M., Gies, D.; McCray, G.; y Huang, M. (1989) *The human cytomegalovirus major immediate early promoter can be trans-activated by adenovirus early proteins*. Virology. 171:377-385.
- Goto, M.; Akai, K.; Murakami, A.; Hashimoto, C.; Tsuda, E.; Ueda, M.; Kawanishi, G.; Takahashi, N.; Ishimoto, A.; Chiba, H. y Sasaki, R. (1988) *Production of Recombinant Human Erythropoietin in Mammalian Cells: Host-Cell Dependency of the Biological Activity of the Cloned Glycoprotein*. Nature Biotechnology. 6:67-71.
- Grabenhorst, E.; Schlenke, P.; Pohl, S.; Nimtz, M. y Conradt, H. S. (1999) *Genetic engineering of recombinant glycoproteins and the glycosylation pathway in mammalian host cells*. Glycoconj. J. 16:81-97.
- Graham, F.L.; Smiley, J.; Russell, W.C. y Nairn, R. (1977) *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5*. J. Gen Virol. 36:59-74.
- Grampp, G. y Ramanan, S. (2015) *The Diversity of Biosimilar Design and Development: Implications for Policies and Stakeholders*. BioDrugs. 29:365-372.
- Green, A.E.; Athereya, B.; Lehr, H.B. y Coriell, L.L. (1967) *Viability of cultures following extended preservation in liquid nitrogen*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 124:1302-1307.
- Grossmann, M.; Szkudlinski, M.W.; Tropea, J.E.; Bishop, L.A.; Thotakura, N.R.; Schofield, P.R. y Weintraub, B.D. (1995) *Expression of human thyrotropin in cell lines with different glycosylation patterns combined with mutagenesis of specific glycosylation sites. Characterization of a novel role for the oligosaccharides in the in vitro and in vivo bioactivity*. J. Biol. Chem. 270:29378-29385.
- Gugliotta, A. (2010). Tesina de Licenciatura en Biotecnología: *Moléculas hiperglicosiladas de IFN- α 2b recombinante humano: potenciales medicamentos de última generación e salud humana*. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL. Santa Fe, Argentina.
- Guile, G.R.; Rudd, P.M.; Wing, D.R.; Prime, S.B. y Dwek, R.A. (1996). *A rapid high-resolution high-performance liquid chromatographic method for separating glycan mixtures and analyzing oligosaccharide profiles*. Anal. Biochem. 240:210-226.

Gutterman, J.U. (1994) *Cytokine therapeutics: Lessons from interferon α* . Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 1198-1205.

Hames, B.D. (1990) *One-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis*. En: *Gel electrophoresis of proteins. A practical approach*. (Eds.: Hames, B.D., Rickwood, D.). Oxford University Press, Inc., New York, EE.UU. p.1-147.

Harlow, E.; Lane, D. (1988) *Immunizations*. En: *Antibodies. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, EE.UU., cap. 5, p. 53-137.

Hasegawa, T. (1996) *History and evolution of culture maintenance and preservation techniques*. En: *Maintaining cultures for biotechnology and industry*. (Eds.: Hunter-Cevera, J.C., Belt, A.). Academic Press, Inc., San Diego, EE.UU. p. 15-27.

Hauser, H. (1997) *Heterologous expression of genes in mammalian cells*. En: *Mammalian cell biotechnology in protein production*. (Eds.: Hauser, H., Wagner, R.). Walter de Gruyter & Co., Berlín, Alemania. p. 3-27.

Hawley-Nelson, P.; Ciccarone, V.; Gebevehu, G.; Jessee, J. (1993) *A new polycationic liposome reagent with enhanced activity for transfection*. FASEB J. 7: a167.

Hay, R.J. (1986) *Preservation and characterisation*. En: *Animal cell culture. A practical approach*. (Ed.: Freshney, R.I.). IRL Press, Oxford, Inglaterra. p. 71-112.

Higel, F.; Seidl, A.; Sorgel, F. y Friess, W. (2016). *N-glycosylation heterogeneity and the influence on structure, function and pharmacokinetics of monoclonal antibodies and Fc fusion proteins*. Eur. J. Pharm. Biopharm. 100:94-100.

Ho, S.N.; Hunt, H.D.; Horton, R.M.; Pullen, J.K.; Pease, L.R. (1989) *Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction*. Gene. 77(1):51-59.

Hossler, P.; Khattak, F.S. y Jian, Z. (2009) *Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture*. Glycobiology. 19(9):936-949.

Imperiali, B. y O'Connor, S.E. (1999) *Effect of N-linked glycosylation on glycopeptide and glycoprotein structure*. Curr. Opin. Chem. Biol. 3(6):643-649.

Indraccolo, S. (2010) *Interferon- α as angiogenesis inhibitor: Learning from tumor models*. Autoimmunity. 43(3): 244–247.

Isaacs, A. y Lindenmann, J. (1957) *Virus interference I. The interferon*. Proc. R. Soc. London Ser. B. 147:258-267.

Jadhav, V.; Hackl, M.; Druz, A.; Shridhar, S.; Chung, C.-Y.; Heffner, K.M.; Kreil, D.P.; Betenbaugh, M.; Shiloach, J.; Barron, N.; Grillari, J. y Borth, N. (2013) *CHO microRNA engineering is growing up: recent successes and future challenges*. Biotechnol. Adv. 31: 1501–1513.

Jayapal, K. y Wlaschin, K. (2007) *Recombinant protein therapeutics from CHO cells-20 years and counting*. Chem. Eng. Prog. 103: 40–47.

Jenkins, N.; Parekh, R.B. y James, D.C. (1996) *Getting the glycosylation right: implications for the biotechnology industry*. Nat. Biotechnol. 14:975-981.

Jonasch, E. y Haluska, F.G. (2001) *Interferon in Oncological Practice: Review of Interferon Biology, Clinical Applications, and Toxicities*. The Oncologist. 6(1):34-55.

- Joung, C.H.; Shin, J.Y.; Koo, J.K.; Lim, J.J.; Wang, J.S.; Lee, S.J.; Tan, H.K.; Kim, S.L. y Lim, S.M. (2009) *Production and characterization of long-acting recombinant human albumin-EPO fusion protein expressed in CHO cell*. *Protein Expr. Purif.* 68(2):137-145.
- Kaighn, M.E.; Narayan, K.S.; Ohnuki, Y.; Lechner, J.F.; Jones, L.W. (1979) *Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3)*. *Invest. Urol.* 17 (1): 16-23.
- Kantardjieff, A. y Zhou, W. (2014) *Mammalian Cell Cultures for Biologics Manufacturing*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 139:1–9.
- Kaup, M.; Saul, V.V.; Lusch, A.; Dörsing, J.; Blanchard, V.; Tauber, R. y Berger, M. (2011) *Construction and analysis of a novel peptide tag containing an unnatural N-glycosylation site*. *FEBS Lett.* 585(14):2372-2376.
- Kim, V. N.; Mitrophanous, K.; Kingsman, S. M. y Kingsman, A. J. (1998) *Minimal requirement for a lentivirus vector based on human immunodeficiency virus type 1*. *J. Virol.* 72:811–816.
- Kimchi-Sarfaty, C.; Schiller, T.; Hamasaki-Katagiri, N.; Khan, M.A.; Yanover, C.; Sauna, Z.E. (2013) *Building better drugs: developing and regulating engineered therapeutic proteins*. *Trends Pharmacol. Sci.* 34(10):534-548.
- Kinstler, O.; Moulinex, G.; Treheit, M.; Ladd, D. y Gegg, C. (2002) *Mono-N-terminal poly(ethylene glycol)–protein conjugates*. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54:477–485.
- Klein, E.; Klein, G.; Nadkarni, J.S.; Nadkarni, J.J.; Wigzell, H.; Clifford, P. (1968) *Surface IgM-kappa specificity on a Burkitt lymphoma cell in vivo and in derived culture lines*. *Cancer Res.* 28(7):1300-1310.
- Klein, J.; Lobel, L.; Pollak, S.; Ferin, M.; Xiao, E.; Sauer, M. y Lustbader, J.W. (2002) *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of single-chain recombinant human folliclestimulating hormone containing the human chorionic gonadotropin carboxyterminal peptide in the rhesus monkey*. *Fertil Steril.* 77(6):1248-1255.
- Klein, J.; Lobel, L.; Pollak, S.; Lustbader, B.; Ogden, R.T.; Sauer, M.V. y Lustbader, J.W. (2003) *Development and characterization of a long-acting recombinant hFSH agonist*. *Hum. Reprod.* 18(1):50-56.
- Knop, K.; Hoogenboom, R.; Fischer, D.; y Schubert, U.S. (2010) *Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives*. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 49(36):6288-6308.
- Kochevar, J. (1990) *Blockage of autonomous growth of ACHN cells by anti-renal cell carcinoma monoclonal antibody 5F4*. *Cancer Res.* 20: 2968-2972.
- Kontsek, P. (1994) *Human type I interferons: structure and function*. *Acta virol.* 38:345-360.
- Krause, C.D.; Pestka, S. (2007) *Historical developments in the research of interferon receptors*. *Cytokine Growth Factor Rev.* 18 (5): 473-482.
- Kruse, N.; Spencer, S. y Wirth, D. (2014) *Rational approaches for transgene expression: targeted integration and episomal maintenance*. En: *Animal Cell Biotechnology: In Biologics Production*. (Eds: Hauser, H. y Wagner, R.) De Gruyter. Braunschweig, Alemania p. 173-215.
- Kruzel, M.L., Seman, G., Georgiades, J.A. (1993) *Molecular species occurring in naturally induced interferon alpha*. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 41(3-4):179-183.

- Laemmli, U.K. (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4*. Nature. 227: 680-685.
- Lee, D.E.; Son, W.; Ha, B.J.; Oh, M.S. y Yoo, O.J. (2006) *The prolonged half-lives of new erythropoietin derivatives via peptide addition*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 339(1):380-385.
- Leibo, S.P. y Mazur, P. (1971) *The role of cooling rates in low-temperature preservation*. Cryobiology. 8(5):447-452.
- Li, H. y d'Anjou, M. (2009) *Pharmacological significance of glycosylation in therapeutic proteins*. Curr. Opin. Biotechnol. 20(6):678-684.
- Lindner, D.J. (2002) *Interferons As Antiangiogenic Agentes*. Current Oncology Reports. 4:510-514.
- Ling, L.E.; Zafari, M.; Reardon, D.; Brickelmaier, M.; Goelz, S.E. y Benjamin, C.D. (1995). *Human Type I interferon receptor, IFNAR, is a heavily glycosylated 120-130 kDa membrane protein*. J. Interferon Cytokine Res. 15:55-56.
- Lisowska, E. (2002) *The role of glycosylation in protein antigenic properties*. Cell. Mol. Life Sci. 59:445-455.
- Llop, E.; Gutierrez-Gallego, R.; Segura, J.; Mallorqui, J. y Pascual, J.A. (2008). *Structural analysis of the glycosylation of gene-activated erythropoietin (epoetin delta, Dynepo)*. Anal. Biochem. 383:243-254.
- Loignon, M.; Perret, S.; Kelly, J.; Boulais, D.; Cass, B.; Bisson, L.; Afkhamizarreh, F. y Durocher, Y. (2008) *Stable high volumetric production of glycosylated human recombinant IFN α 2b in HEK293 cells*. BMC Biotechnol. 8:65.
- Lovelock, J.E. y Bishop, M.W.H. (1959) *Prevention of freezing damage to living cells with dimethyl sulphoxide*. Nature 183:1394-1395.
- Macher B. A. y Galili, U. (2008) *The Gal α 1,3Gal β 1,4GlcNAc-R (alpha-Gal) epitope: a carbohydrate of unique evolution and clinical relevance*. Biochim. Biophys. Acta. 1780:75-88.
- Madin, S.H. y Darby, N.B.Jr. (1958) *Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 98:574-576.
- Mahmood, I. y Green, M.D. (2005) *Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations in the development of therapeutic proteins*. Clin. Pharmacokinet. 44:331-347.
- Makrides, S. C. (1999) *Components for vectors for gene transfer and expression in mammalian cells*. Protein Expr. Purif. 17:183-202.
- Manning, M.C.; Chou, D.K.; Murphy, B.M.; Payne, R.W. y Katayama, D.S. (2010) *Stability of protein pharmaceuticals: an update*. Pharm. Res. 27(4):544-575.
- Margni, R. (1996) *Inmunología e inmuoquímica. Fundamentos*. (Ed.: Margni, A.). Editorial Panamericana S.A., Buenos Aires, Argentina. Apéndice III, p. 960-961.
- Marshall, S.A.; Lazar, G.A.; Chirino, A.J.; Desjarlais, J.R. (2003) *Rational design and engineering of therapeutic proteins*. Drug Discov. Today. 8(5):212-221.

- Matasci, M.; Hacker, D.L.; Baldi, L. y Wurm, F.M. (2008) *Recombinant therapeutic protein production in cultivated mammalian cells: current status and future prospects*. Drug Discov. Today Technol. 5(2-3):37-42.
- Mather, J.P. (1991) *Optimizing cell and culture environment for production of recombinant proteins*. En: Methods in Enzymology, Vol. 185: *Gene expression technology*. (Ed.: Goeddel, D.). Academic Press, Inc., San Diego, EE.UU. p. 567-577.
- Meager, A. (2002) *Biological assays for interferons*. J. Immunol. Methods. 261:21-36.
- Merigan, T.C. (1967) *Interferons of Mice and Men*. N. Engl. J. Med. 276: 913–920.
- Meyer, O. (2009) *Interferons and autoimmune disorders*. Joint Bone Spine. 76: 464-473.
- Milano, F. (2001) Tesina de Licenciatura en Biotecnología: *Diseño y validación de bioensayos para la valoración biológica in vitro de fármacos*. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL. Santa Fe, Argentina.
- Mire-Sluis, A.R.; Page, L.; Thorpe, R. (1995) *Quantitative cell line based bioassays for human cytokines*. J. Immunol. Methods 187: 191-199.
- Mitchell, R. S.; Beitzel, B. F.; Schroder, A. R.; Shinn, P.; Chen, H.; Berry, C. C.; Ecker, J. R. y Bushman, F.D. (2004) *Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences*. PLoS Biol. 2(8): e234, 1127-1137.
- Morell, A.G.; Gregoriadis, G.; Scheinberg, I.H.; Hickman, J. y Ashwell, G. (1971) *The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation*. J. Biol. Chem. 246:1461-1467.
- Mueller, P.P.; Wirth, D.; Unsinger, J.; y Hauser, H. (2003), *Genetic Approaches to Recombinant Protein Production in Mammalian Cells*. En: Handbook of Industrial Cell Culture. (Eds: Vinci, V.A. y Parekh, S.R.) Humana Press Inc. Totowa, N.J. p.21:49.
- Mufarrege, E. F.; Antuña, S.; Etcheverrigaray, M.; Kratje, R. y Prieto, C. (2014) *Development of lentiviral vectors for transient and stable protein overexpression in mammalian cells. A new strategy for recombinant human FVIII (rhFVIII) production*. Protein Expr. Purif. 95:50-56.
- Nadkarni, J.S.; Nadkarni, J.J.; Clifford, P.; Manolov, G.; Fenyo, E.M. y Klein, E. (1969) *Characteristics of new cell lines derived from Burkitt lymphomas*. Cancer 23 (1): 64-79.
- Nagata, S.; Taira, H.; Hall, A.; Johnsrud, L.; Streuli, M.; Ecsödi, J.; Boll, W.; Cantell, K. y Weissmann, C. (1980) *Synthesis in E. coli of a Polypeptide With Human Leukocyte Interferon Activity*. Nature. 284:316–320.
- Nederman, T.; Karlström, E.; Sjödin, L. (1990) *An in vitro bioassay for quantitation of human interferons by measurements of antiproliferative activity on a continuous human lymphoma cell line*. Biologicals 18 (1): 29-34.
- Nelson, D.R.; Benhamou, Y.; Chuang W.L.; Lawitz, E.J.; Rodriguez-Torres, M.; Flisiak, R.; Rasenack, J.W.; Kryczka, W.; Lee, C.M.; Bain, V.G.; Pianko, S.; Patel, K.; Cronin, P.W.; Pulkstenis, E.; Subramanian, G.M.; McHutchison, J.G. y ACHIEVE-2/3 Study Team. (2010) *Albinterferon alfa-2b was not inferior to pegylated interferon-a in a randomized trial of patients with chronic hepatitis C virus genotype 2 or 3*. Gastroenterol. 139:1267–1276.
- Noh, S. M.; Sathyamurthy, M. y Lee, G.M. (2013) *Development of recombinant Chinese hamster ovary cell lines for therapeutic protein production*. Curr. Opin. Chem. Ing. 2:391-397.

- Novick, D.; Cohen, B. y Rubinstein, M. (1994) *The human interferon α/b receptor: characterization and molecular cloning*. Cell 77:391–400.
- Nyman, T.A.; Tölö, H.; Parkkinen, J.; Kalkkinen, N. (1998a) *Identification of nine interferon- α subtypes produced by Sendai virus-induced human peripheral blood leukocytes*. Biochem. J. 329:295-302.
- Nyman, T.A.; Kalkkinen, N.; Tölö, H. y Helin, J. (1998b) *Structural characterisation of N-linked and O-linked oligosaccharides derived from interferon- $\alpha 2b$ and interferon- $\alpha 14c$ produced by Sendai-virus-induced human peripheral blood leukocytes*. Eur. J. Biochem. 253:485-493.
- Oberbek, A.; Matasci, M.; Hacker, D. L. y Wurm, F. M. (2011) *Generation of stable, high-producing CHO cell lines by lentiviral vector-mediated gene transfer in serum-free suspension culture*. Biotechnol Bioeng. 108:600-610.
- Osborn, B.L.; Olsen, H.S.; Nardelli, B.; Murray, J.H.; Zhou, J.X.; Garcia, A.; Moody, G.; Zaritskaya, L.S. y Sung, C. (2002). *Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of a human serum albumin-interferon-alpha fusion protein in cynomolgus monkeys*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 303(2):540-548.
- Otto, V.I.; Schurpf, T.; Folkers, G. y Cummings, R.D. (2004) *Sialylated complex-type N-glycans enhance the signaling activity of soluble intercellular adhesion molecule-1 in mouse astrocytes*. J Biol Chem 279: 35201-35209.
- Pan, Y.; Kytola, S.; Farnebo, F.; Wang, N.; Lui, W.O.; Nupponen, N.; Isola, J.; Visakorpi, T.; Bergerheim, U.S. y Larsson, C. (1999) *Characterization of chromosomal abnormalities in prostate cancer cell lines by spectral karyotyping*. Cytogenet. Cell Genet. 87 (3-4): 225-232.
- Pantelouris, E.M. (1971) *Observations on the immunobiology of "nude" mice*. Immunology 20: 247-252.
- Pasut, G. y Veronese, F.M. (2007) *Polymer–drug conjugation, recent achievements and general strategies*. Prog. Polym. Sci. 32: 933–961.
- Paul, F.; Pellegrini, S. y Uzé, G. (2015) *IFNA2: The prototypic human alpha interferón*. Gene. 567(2):132-137.
- Perlman, S.; van den Hazel, B.; Christiansen, J.; Gram-Nielsen, S.; Jeppesen, C.B.; Andersen, K.V.; Halkier, T.; Okkels, S.; Schambye, H.T. (2003) *Glycosylation of an N-terminal extension prolongs the half-life and increases the in vivo activity of follicle stimulating hormone*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 88(7):3227-3235.
- Persano, L.; Moserle, L.; Esposito, G.; Bronte, V.; Barbieri, V.; Iafrate, M.; Gardiman, M.P.; Larghero, P.; Pfeffer, U.; Naschberger, E.; Sturzl, M.; Indraccolo, S. y Amadori, A. (2009) *Interferon-alpha counteracts the angiogenic switch and reduces tumor cell proliferation in a spontaneous model of prostatic cancer*. Carcinogenesis. 30:851–860.
- Pestka, S. (2007) *The interferons: 50 years after their discovery, there is much more to learn*. J. Biol. Chem. 282(28):20047-20051.
- Peter-Katalinić, J. (2005) *Methods in enzymology: O-glycosylation of proteins*. Methods Enzymol. 405:139-171.
- Pfeffer, L.M.; Basu, L.; Pfeffer, S.R.; Yang, C.H.; Murti, A.; Russell-Harde, D. y Croze, E. (1997). *The short form of the interferon α/b receptor chain 2 acts as a dominant negative for Type I interferon action*. J. Biol. Chem. 272:11002–11005.

- Pham, P. L.; Kamen, A. y Durocher, Y. (2006) *Large-scale transfection of mammalian cells for the fast production of recombinant protein*. Mol. Biotechnol. 34: 225–237.
- Picanço-Castro, V.; de Sousa Russo-Carbolante, E. M. y Tadeu Covas, D. (2012) *Advances in Lentiviral Vectors: A Patent Review*. Recent Patents DNA.Gene.Seq 6:82-90.
- Piehler, J. y Schreiber, G. (1999) *Mutational and structural analysis of the binding interface between type I interferons and their receptor Ifnar2*. J. Mol. Biol. 294(1):223-237.
- Piehler, J.; Roisman, L.C. y Schreiber, G. (2000) *New structural and functional aspects of the type I interferon-receptor interaction revealed by comprehensive mutational analysis of the binding interface*. J. Biol. Chem. 275(51):40425-40433.
- Puck, T.; Cieciura, S. y Robinson, A. (1958) *Genetics of somatic mammalian cells III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects*. J. Exp. Med. 108: 945-956.
- Rachmawati, H.; Poelstra, K.; Beljaars, L. (2004) *The use of cytokines and modified cytokines as therapeutic agents: present state and future perspectives*. En: *Recent research development in immunology*. Vol. 6. Research Signpost, Kerala, India, cap. 2, p.191-214.
- Radhakrishnan, R.; Walter, L.J.; Hruza, A.; Reichert, P.; Trotta, P.P.; Nagabhushan, T.L.; Walter, M.R. (1996). *Zinc mediated dimer of human interferon- α 2b revealed by X-ray crystallography*. Structure 4 (12):1453-1463.
- Reddy, K.R.; Modi, M.W. y Pedder, S. (2002) *Use of peginterferon α 2a (40KD) (Pegasys) for the treatment of hepatitis C*. Adv. Drug Deliv. Rev.54:571–586.
- Renard, J.M.; Spagnoli, R.; Mazier, C.; Salles, M.F. y Mandine, E. (1988) *Evidence that monoclonal antibody production kinetics is related to the integral of the viable cells curve in batch systems*. Biotechnol Lett 10: 91 96.
- Restelli, V.; Butler, M. (2002) *The effect of cell culture parameters on protein glycosylation*. En: *Cell engineering*, Vol. 3: Glycosylation. (Ed.: Al-Rubeai, M.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Países Bajos, cap. 2, p. 61-92.
- Roberts, M.J.; Bentley, M.D.; Harris, J.M. (2002) *Chemistry for peptide and protein PEGylation*. Adv. Drug Deliv. Rev. 54: 459-476.
- Roisman, L.C.; Piehler, J.; Trosset, J.; Scheraga, H.A.; Schreiber, G. (2001) *Structure of the interferon-receptor complex determined by distance constraints from double mutant cycles and flexible docking*. PNAS 98 (23): 13231-13236.
- Roisman, L.C.; Jaitin, D.A.; Baker, D.P.; Schreiber, G. (2005) *Mutational analysis of the IFNAR1 binding site on IFN- α 2 reveals the architecture of a weak ligand-receptor binding-site*. J. Mol. Biol. 353: 271-281.
- Rosenlocher, J.; Sandig, G.; Kannicht, C.; Blanchard, V.; Reinke, S.O. y Hinderlich, S. (2016). *Recombinant glycoproteins: The impact of cell lines and culture conditions on the generation of protein species*. J Proteomics. 134:85-92
- Royle, L.; Campbell, M.P.; Radcliffe, C.M.; White, D.M.; Harvey, D.J.; Abrahams, J.L.; Kim, Y.G.; Henry, G.W.; Shadick, N.A.; Weinblatt, M.E.; Lee, D.M.; Rudd, P.M. y Dwek, R.A. (2008). *HPLC-based analysis of serum N-glycans on a 96-well plate platform with dedicated database software*. Anal Biochem. 376:1-12.

- Rubinstein, M.; Levy, W.P.; Moschera, J.A.; Lai, C.Y.; Hershberg, R.D.; Bartlett, R.T. y Pestka, S. (1981) *Human leukocyte interferon: isolation and characterization of several molecular forms*. Arch. Biochem. Biophys. 210(1): 307–318.
- Rubinstein, M.; Rubinstein, S.; Familletti, P.C.; Miller, R.S. y Waldman, A.A. (1978) *Human leukocyte interferon purified to homogeneity*. Science 202: 1289–1290.
- Rubinstein, M.; Rubinstein, S.; Familletti, P.C.; Miller, R.S.; Waldman, A.A. y Pestka, S. (1979). *Human leukocyte interferon: production, purification to homogeneity, and initial characterization*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76(2): 640–644.
- Rudd, P.M.; Dwek, R.A. (1997) Glycosylation: heterogeneity and the 3D structure of proteins. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 32 (1): 1-100.
- Ruiz, L., Aroche, K., Reyes, N. (2006) *Aggregation of Recombinant Human Interferon Alpha 2b in Solution: Technical Note*. PharmSciTech. 7(4):118-122.
- Runkel, L.; Pfeffer, L.; Lewerenz, M.; Monneron, D.; Yang, C.H.; Murti, A.; Pellegrini, S.; Goelz, S.; Uze, G. y Mogensen, K. (1998). *Differences in Activity Between Alpha and Beta Type I Interferons Explored by Mutational Analysis*. J. Biol. Chem. 273:8003–8008.
- Sadler, A.J. y Williams, B.R. (2008). *Interferon-inducible antiviral effectors*. Nat. Rev. Immunol. 8:559-568.
- Sakuma, T.; Barry, M. A. e Ikeda, Y. (2012) *Lentiviral vectors: basic to translational*. Biochem. J. 443: 603–618.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989a) *Bacterial media, antibiotics and bacterial strains*. En: *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. (Ed.: Nolan, C.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EE.UU., apéndice A.5.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989b) *Spectrophotometric determination of the amount of DNA or RNA*. En: *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. (Ed.: Nolan, C.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EE.UU., apéndice E.5.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989c) *Gel electrophoresis of DNA*. En: *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. (Ed.: Nolan, C.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EE.UU., cap. 6, p. 6.1-6.62.
- Schellenberger, V.; Wang, C.W.; Geething, N.C.; Spink, B.J.; Campbell, A.; To, W.; Scholle, M.D.; Yin, Y.; Yao, Y.; Bogin, O.; Cleland, J.L.; Silverman, J. y Stemmer, W.P. (2009) *A recombinant polypeptide extends the in vivo half-life of peptides and proteins in a tunable manner*. Nat. Biotechnol. 27:1186–1190.
- Sen, G.C. y Lengyel, P. (1992) *The interferon system. A bird's eye view of its biochemistry*. J. Biol. Chem. 267: 5017-5020.
- Shahrokh, Z.; Royle, L.; Saldova, R.; Bones, J.; Abrahams, J.L.; Artemenko, N.V.; Flatman, S.; Davies, M.; Baycroft, A.; Sehgal, S.; Heartlein, M.W.; Harvey, D.J. y Rudd, P.M. (2010) *Erythropoietin produced in a human cell line (Dynepo) has significant differences in glycosylation compared with erythropoietins produced in CHO cell lines*. Mol. Pharm. 8:286-296
- Shargel, L., Wu-Pong, S., Yu, A.B.C. (2005) *Multicompartmental models: intravenous bolus administration*. En: *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics*. McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York, EE.UU., cap. 4, p. 73-105.

- Shental-Bechor, D. y Levy, Y. (2008) *Effect of glycosylation on protein folding: A close look at thermodynamic stabilization*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 105(24):8256-8261.
- Sinclair, A.M. y Elliott, S. (2005) *Glycoengineering: the effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins*. J. Pharm. Sci 94:1626-1635.
- Sola, R.J. y Griebenow, K. (2010) *Glycosylation of therapeutic proteins: an effective strategy to optimize efficacy*. BioDrugs 24:9-21.
- Song, R.; Oren, D.A.; Franco, D.; Seaman, M.S. y Ho, D.D. (2013). *Strategic addition of an N-linked glycan to a monoclonal antibody improves its HIV-1-neutralizing activity*. Nat. Biotechnol. 31(11):1047-1052.
- Sotoca Momblona, J.M. (1999) *Cuarenta años de interferones*. Farm. Hosp. 23(4):205-213.
- Stark, G.R.; Kerr, I.M.; Williams, B.R.; Silverman, R.H. y Schreiber, R.D. (1998). *How cells respond to interferons*. Annu. Rev. Biochem. 67:227–264.
- Streuli, M.; Nagata, S. y Weissman, C. (1980) *At Least Three Human Type α Interferons: Structure of $\alpha 2$* . Science. 209:1343–1347.
- Strohl, W.R. (2015) *Fusion Proteins for Half-Life Extension of Biologics as a Strategy to Make Biobetters*. BioDrugs. 29:215–239.
- Subramanian, G.M.; Fischella, M.; Lamouse-Smith, A.; Zeuzem, S. y McHutchison, J.G. (2007) *Albinterferon a-2b: a genetic fusion protein for the treatment of chronic hepatitis C*. Nature Biotechnol. 25:1411–1419.
- Suen, K.F.; Turner, M.S.; Gao, F.; Liu, B.; Althage, A.; Slavin, A.; Ou, W.; Zuo, E.; Eckart, M.; Ogawa, T.; Yamada, M.; Tuntland, T.; Harris, J.L. y Trauger, J.W. (2010) *Transient expression of an IL-23R extracellular domain Fc fusion protein in CHO vs. HEK cells results in improved plasma exposure*. Protein Expr. Purif. 71: 96-102.
- Swiech, K.; Picanço-Castro, V. y Tadeu Covas, D. (2012) *Human cells: New platform for recombinant therapeutic protein production*. Protein Expr. Purif. 84:147-153.
- Takahashi, M.; Kuroki, Y.; Ohtsubo, K. y Taniguchi, N. (2009) *Core fucose and bisecting GlcNAc, the direct modifiers of the N-glycan core: their functions and target proteins*. Carbohydr. Res. 344: 1387-1390.
- Takeuchi, M.; Takasaki, S.; Shimada, M. y Kobata, A. (1990) *Role of sugar chains in the in vitro biological activity of human erythropoietin produced in recombinant chinese hamster ovary cells*. J. Biol. Chem. 265 (21):12127-12130.
- Thomas, C.; Moraga, I.; Levin, D.; Krutzik, P.O.; Podoplelova, Y.; Trejo, A.; Lee, C.; Yarden, G.; Vleck, S.E.; Glenn, J.S.; Nolan, G.P.; Piehler, J.; Schreiber, G. y Garcia, K.C. (2011) *Structural linkage between ligand discrimination and receptor activation by type I interferons*. Cell. 146: 621-632.
- Tomayko, M.M. y Reynolds, C.P. (1989) *Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice*. Cancer Chemother. Pharmacol. 24(3):148-154.
- Tovey, M.G. y Lallemand, C. (2010) *Safety, Tolerability, and Immunogenicity of Interferons*. Pharmaceuticals. 3:1162-1186.
- Tovey, M.G.; Lallemand, C. y Thyphronitis, G. (2008) *Adjuvant activity of type I interferons*. Biol. Chem. 389:541-545.

- Trainer, P.J.; Drake, W.M.; Katznelson, L.; Freda, P.U.; Herman-Bonert, V.; van der Lely, A.J.; Dimaraki, E.V.; Stewart, P.M.; Friend, K.E.; Vance, M.L.; Besser, G.M.; Scarlett, J.A.; Thorner, M.O.; Parkinson, C.; Klibanski, A.; Powell, J.S.; Barkan, A.L.; Sheppard, M.C.; Malsonado, M.; Rose, D.R.; Clemmons, D.R.; Johannsson, G.; Bengtsson, B.A.; Stavrou, S.; Kleinberg, D.L.; Cook, D.M.; Phillips, L.S.; Bidlingmaier, M.; Strasburger, C.J.; Hackett, S.; Zib, K.; Bennett, W.F. y Davis, R.J. (2000) *Treatment of acromegaly with the growth hormone-receptor antagonist pegvisomant*. N. Engl. J. Med. 342:1171–1177.
- Trousdale, R.K.; Yu, B.; Pollak, S.V.; Husami, N.; Vidali, A. y Lustbader, J.W. (2009) *Efficacy of native and hyperglycosylated folliclestimulating hormone analogs for promoting fertility in female mice*. Fertil. Steril. 91: 265–270.
- Urlaub, G. y Chasin, L.A. (1980) *Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 4216–4220.
- Uze, G.; Lutfalla, G.; Bandu, M.-T.; Proudhon, D. y Mogensen, K.E. (1992). *Behaviour of a cloned murine interferon α/b receptor expressed in homospecific or heterospecific background*. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 89:4774–4778.
- Van den Steen, P.; Rudd, P.M.; Dwek, R.A. y Opdenakker, G. (1998) *Concepts and principles of O-linked glycosylation*. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 33(3):151-208.
- Varki, A. (1993) *Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct*. Glycobiology 3 (29), 97-130.
- Vilcek, J. y Feldmann, M. (2004) *Historical review: Cytokines as therapeutics and targets of therapeutics*. Trends Pharmacol. Sci. 24(4):201-209.
- Vilcek, J.; Sen, G.C. (1996) *Interferons and other cytokines*. En: *Fields Virology*, Vol. 2. (Eds.:Fields, B.N.; Knipe, D.M., Howley, P.M.). Lippincott Williams and Wilkins, Boston, EE.UU., cap.13, p. 375-399.
- Walsh, G. (2010) *Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals*. Drug Discov. Today. 15(17-18):773-780.
- Wang, M.; Ishino, T.; Joyce, A.; Tam, A.; Duan, W.; Lin, L.; Somers, W.S.; Kriz, R. y O'Hara, D.M. (2015) *Faster in vivo clearance of human embryonic kidney than Chinese hamster ovary cell derived protein: Role of glycan mediated clearance*. J. Biosci. Bioeng. 119: 657-719.
- Wang, Y.S.; Youngster, S.; Grace, M.; Bausch, J.; Bordens, R. y Wyss, D.F. (2002) *Structural and biological characterisation of pegylated recombinant interferon α -2b and its therapeutic implications*. Adv. Drug Deliv. Rev. 54: 547–570.
- Weenen, C.; Peña, J.E.; Pollak, S.V.; Klein, J.; Lobel, L.; Trousdale, R.K.; Palmer, S.; Lustbader, E.G.; Ogden, R.T. y Lustbader, J.W. (2004). *Long-acting follicle-stimulating hormone analogs containing N-linked glycosylation exhibited increased bioactivity compared with o-linked analogs in female rats*. J Clin Endocrinol Metab. 89(10):5204-5212.
- Weiner, M.P.; Gackstetter, T.; Costa, G.L.; Bauer, J.C. y Kretz, K.A. (1995) *Molecular Biology: Current innovations and future trends*. (Eds. Griffin, M.A. and Griffin, H.G.) Horizon Scientific Press. Wymondham, Norfolk, U.K. p. 1-461.
- Wetzel, R. (1981) *Assignment of the Disulphide Bonds of Leukocyte Interferon*. Nature. 289:606–607.
- Wirth, D. y Hauser, H. (2004) *Flp-mediated integration of expression cassettes into FRT-tagged chromosomal loci in mammalian cells*. Methods. Mol. Biol. 267: 467-476.

- Wirth, D.; Gama-Norton, L.; Riemer, P.; Sandhu, U.; Schucht, R. y Hauser, H. (2007) *Road to precision: recombinase-based targeting technologies for genome engineering*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18(5): 411-419.
- Witte, K.; Witte, E.; Sabat, R. y Wolk, K. (2010) IL-28A, IL-28B, and IL-29: promising cytokines with type I interferon-like properties. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21(4):237-251.
- Witthöft, T. (2008). *Review of consensus interferon in the treatment of chronic hepatitis C*. *Biologics.* 2(4):635–643.
- Wiznerowicz, M. y Trono, D. (2005) *Harnessing HIV for therapy, basic research and biotechnology*. *Trends Biotechnol.* 23:42–47.
- Wu, X.; Li, Y.; Crise, B. y Burgess, S.M. (2003) *Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration*. *Science.* 300:1749-1751.
- Xiao, S.; Shiloach, J. y Betenbaugh, M.J. (2014) *Engineering cells to improve protein expression*. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 26:32–38.
- Zhang J. (2010) *Mammalian cell culture for biopharmaceutical production*. En: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 3rd edition (Eds: Baltz R, Demain A, Davies J, Bull A, Junker B, Katz L, Lynd L, Masurekar P, Reeves C, Zhao H) ASM Press, Washington, DC. p. 157–178.
- Zhao, H.L.; Yao, X.Q.; Xue, C.; Wang, Y.; Xiong, X.H. y Liu ZM. (2008) *Increasing the homogeneity, stability and activity of human serum albumin and interferon α 2b protein by linker engineering*. *Prot. Exp. Purif.* 61:73–77.
- Zhu, J. (2012) *Mammalian cell protein expression for biopharmaceutical production*. *Biotechnol. Adv.* 30:1158–1170.
- Zhu, Y.; Jiang, J.L.; Gumlaw, N.K.; Zhang, J.; Bercury, S.D.; Ziegler, R.J.; Lee, K.; Kudo, M.; Canfield, W.M.; Edmunds, T.; Jiang, C.; Mattaliano, R.J. y Cheng, S.H. (2009) *Glycoengineered acid α -glucosidase with improved efficacy at correcting the metabolic aberrations & motor function deficits in a mouse model of Pompe disease*. *Mol. Ther.* 17:954–963.
- Zhu, Y.; Li, X.; McVie-Wylie, A.; Jiang, C.; Thurberg, B.L.; Raben, N.; Mattaliano, R.J. y Cheng, S.H. (2005) *Carbohydrate-remodelled acid α -glucosidase with higher affinity for the cation-independent mannose 6 phosphate receptor demonstrates improved delivery to muscles of Pompe mice*. *Biochem. J.* 389:619–628.
- Zitvogel, L.; Galluzzi, L.; Kepp, O.; Smyth, M.J. y Kroemer, G. (2015) *Type I interferons in anticancer immunity*. *Nat. Rev. Immunol.* 15:405-414.
- Zuqueli, R. (2006) Tesis Doctoral: *Desarrollo de una tecnología de producción de interferón β recombinante humano en células eucariontes*. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL, Santa Fe, Argentina.