

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



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

“Bioterapéuticos de segunda generación: desarrollo de versiones mejoradas del IFN- β -1a recombinante humano mediante reducción de su inmunogenicidad”

Lic. Sonia Ricotti

Director de Tesis: Dr. Eduardo F. Mufarrege

Co-directora de Tesis: Dra. Marina Etcheverrigaray

Centro Biotecnológico del Litoral - FBCB - UNL

-2024-

Agradecimientos

A la Universidad Nacional del Litoral y a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, por brindarme la formación profesional necesaria para realizar este trabajo, con educación de calidad, libre y gratuita. Agradecida de poder formar parte de la Cátedra de Inmunología básica, aprendiendo constantemente a formar a otros, devolviendo de esta manera un poco de todo lo que esta institución me brindó.

A CONICET, por financiar mis estudios de doctorado durante estos años.

A Marina y Ricardo, directivos del Centro Biotecnológico del Litoral (CBL), por haberme dado la oportunidad de formar parte de este gran equipo, sosteniendo el crecimiento de todos los que lo formamos, tanto desde el ámbito profesional, con investigaciones de altísima calidad, como desde lo humano y personal. Gracias a todos los integrantes del CBL por hacer del lugar de trabajo un ambiente cálido para compartir los días, con experiencias, conocimientos y cariño.

A mi director, Eduardo, no tengo palabras para agradecerte el compromiso y dedicación con que me guiaste en todo este proceso. Agradecida por tu sostén, por estar siempre que te necesité, por todo lo que me enseñaste y ayudaste, siempre tan profesional y cálido conmigo. ¡Gracias y gracias!

A mi co-directora, Marina, nuevamente gracias por confiar en mí para formar parte del equipo de trabajo, por brindarme tu sabiduría a lo largo de toda esta etapa, por tu comprensión y palabras cálidas en cada momento difícil, por tu aliento, ayuda y dedicación.

Estoy convencida que el cierre de esta etapa nunca lo podría haber logrado sola. Gracias Edu y Marina por incitarme a que la culmine, con tanta ayuda, paciencia y amor.

A Sergio Garay e Ignacio Amadeo, por su ayuda y conocimientos para poder avanzar con el desarrollo de mi trabajo. Siempre tan predispuestos a compartir sus experiencias, y hacer ciencia interdisciplinaria y de calidad.

Muchas gracias a todo el personal de desarrollo de Zeltek, en especial al Negro y Carlitos, por compartir sus conocimientos y brindarnos su ayuda con tanta buena predisposición y buen humor, ante todo.

Gracias al Doc. del laboratorio, Gustavo, por hacer de las horas en el bioterio y el trabajo con animales algo ameno, siempre entre risas y anécdotas. Aprendí muchísimo con vos y estoy muy agradecida por eso.

A todo el equipo de BioSynaptica, por confiar en mí para formar parte de su equipo y dejarme aprender tantas cosas nuevas con ustedes. Fueron muy importantes en esta última etapa de mi paso por el laboratorio. Gracias Mili y Marcos por tantos conocimientos nuevos brindados, por el apoyo y la calidez para conmigo siempre. Y especialmente, a Copo y Delfi, hermoso cruzarnos en este camino, hermosa la amistad que generamos, hermoso tenernos.

A Sofi, Fer y Blondi, que me recibieron con los brazos abiertos cuando llegué, me hicieron parte de ellas en un instante y se convirtieron en mis hermanas. Agradecida a esta instancia de formación por ponerlas en mi camino y que formen parte de mi vida para siempre.

A Fran, Lu, Jesu, Javi, Male, Erne, Pablo, Flor, Juli, Copo y Delfi, el grupo del labo, mucho más que compañeros, amigos para siempre. Juntas hacemos un equipo imbatible. Gracias por hacer de la ciencia un lugar de resguardo hermoso. Crecimos un montón, nos apoyamos un montón, compartimos un montón. Ojalá la vida nos cruce mucho más. Los quiero

A mis amigas, mi red de contención, mi cotidiano. Gracias por estar y alentarme, obvio siempre con un brindis, cada avance por más chiquito que haya sido. La vida con ustedes es hermosa, gracias por ser parte de mi y por dejarme ser parte de ustedes.

A mi familia, mamá, Caro, Clara y papá. Ellas son todo, y son todo lo que necesito para ser feliz. Todo logro es por y gracias a ellas. Son mi sostén, son siempre amor. Afortunada de tenerlas. Las amo.

Aportes Científico-Tecnológicos

Pulicaciones

Ricotti S, Garay AS, Etcheverrigaray M, Amadeo GI, De Groot AS, Martin W, Mufarrege EF. *Development of IFN β -1a versions with reduced immunogenicity and full in vitro biological activity for the treatment of multiple sclerosis*. Clin Immunol. 2023 Dec; 257:109831. doi: 10.1016/j.clim.2023.109831. Epub 2023 Nov 4. PMID: 37931868.

Patentes

Mufarrege EF, Ricotti S, Etcheverrigaray M, Garay AS, De Groot AS, Martin W. Patente de invención *Variantes de interferón beta modificado deinmunizado*. Registrada en el Instituto Nacional de Propiedad Intelectual (INPI), Argentina. Solicitud N° 2358219 (26/07/2023).

Mufarrege EF, Ricotti S, Garay AS, Etcheverrigaray M, De Groot AS, Martin W. Patente de invención *MODIFIED INTERFERON-BETA-1 HAVING REDUCED IMMUNOGENICITY*. Registrada en United States Patent and Trademark Office (USPTO), EE.UU. Solicitud N° EPV0053WO (26/07/2024).

Índice

Agradecimientos	3
Aportes Científico-Tecnológicos	5
Índice	6
Abreviaturas y Símbolos	10
Resumen	16
Abstract	17
Introducción	18
1. PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE USO TERAPÉUTICO	18
2. INTERFERONES COMO CITOQUINAS Y BIOTERAPÉUTICOS	20
2.1 Clasificación y nomenclatura de los interferones	21
2.2 Interferones humanos (hIFNs) tipo I	21
2.3 Síntesis de los hIFNs tipo I	22
2.4 Funciones de los hIFNs tipo I	22
3. IFN-β HUMANO (hIFN-β)	26
3.1 Estructura molecular del hIFN- β	27
3.2 hIFN- β -1a como bioterapéutico para la Esclerosis Múltiple	28
3.2.1 Patogénesis de la EM	29
3.2.2 Mecanismo de acción del IFN- β en EM	31
3.2.3 Inmunogenicidad y efectos adversos asociados a la terapia con rhIFN- β	33
4. MECANISMOS ASOCIADOS A LA INMUNOGENICIDAD DE PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS	35
4.1 Generación de ADAs	35
4.2 Vía de activación de linfocitos B dependiente de linfocitos T y generación de ADAs	36
4.2.1 Internalización de las proteínas extracelulares por las CPAs y presentación antigénica a los linfocitos T CD4 ⁺	37
4.2.2 Activación de los linfocitos T CD4 ⁺	40
4.2.3 Activación T-dependiente de linfocitos B	42
5. MÉTODOS PARA DETERMINAR LA INMUNOGENICIDAD DE PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS	44
5.1 Métodos de predicción de la inmunogenicidad in silico mediante algoritmos computacionales	45
5.2 Validación experimental: ensayos in vitro y ex vivo	47
5.2.1 Validación mediante ensayos in vitro	47
5.2.2 Validación mediante ensayos ex vivo	47
5.3 Métodos in vivo	49
Objetivos	51
Materiales y Métodos	52
1. DESARROLLO DE VARIANTES DE-INMUNIZADAS DE IFN-β-1a MEDIANTE ALGORITMOS DE PREDICCIÓN IN SILICO	52

2. REACTIVOS Y SOLUCIONES	53
3. LÍNEAS CELULARES	54
4. MEDIOS DE CULTIVO	54
4.1 Medios de cultivo para células eucariotas	54
4.2 Medios de cultivo para células procariotas	55
5. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	56
5.1 Digestiones enzimáticas	56
5.2 Electroforesis en geles de agarosa	56
5.3 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa	57
5.4 Purificación mediante precipitación de los fragmentos de ADN digeridos por endonucleasas	57
5.5 Reacciones de ligación de ADN	57
5.6 Preparación de células competentes	57
5.7 Transformación de células competentes	58
5.8 Preparación de ADN plasmídico	59
5.8.1 Minipreparación	59
5.8.2 Maxipreparación	59
5.9 Determinación de la concentración y pureza del ADN	61
5.10 Construcción de los plásmidos pLV-PLK conteniendo las variantes de IFN- β -1a	61
5.11 Criopreservación de células bacterianas	63
5.12 Revitalización de cepas bacterianas	63
6. TÉCNICAS DE CULTIVO DE CÉLULAS ANIMALES	63
6.1 Condiciones de cultivo de células eucariotas	63
6.1.1 Cultivo de células adherentes	64
6.1.2 Cultivo de células en suspensión	64
6.2 Determinación de la concentración celular	65
6.3 Criopreservación de líneas celulares animales	65
6.4 Descongelamiento de líneas celulares animales	66
6.5 Generación de las líneas celulares productoras de las variantes de IFN- β -1a	66
6.5.1 Producción de partículas lentivirales mediante transfección de células HEK-293T/17	66
6.5.2 Transducción de células CHO-K1	69
6.6 Presión de selección con antibiótico de las líneas celulares productoras de las variantes de IFN- β -1a	69
7. PRODUCCIÓN DE LAS VARIANTES DE IFN-β-1a	70
7.1 Cuantificación de las variantes de IFN- β -1a en sobrenadantes de cultivo mediante ELISA sándwich	70
8. PURIFICACIÓN DE LAS DIFERENTES VARIANTES DE IFN-β-1a MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE PSEUDO-AFINIDAD A COLORANTES Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)	72
8.1 Equipamiento	72
8.2 Cromatografía de pseudo-afinidad a colorantes (Blue-Sepharose)	72
8.2.1 Determinación de la concentración y pureza de las variantes de IFN- β -1a purificadas	73
8.3 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	74
8.3.1 Determinación de la concentración y pureza de las variantes de IFN- β -1a purificadas	74
8.4 Concentración y diafiltración de las variantes de IFN- β -1a	75
8.5 Evaluación de la concentración y pureza de las variantes de IFN- β -1a	76

8.5.1 Análisis de la identidad de las variantes de IFN- β -1a mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) seguido de Western blot	76
9. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL Y ANALÍTICA DE LAS VARIANTES DE-INMUNIZADAS DE IFN-β	77
9.1 Valoración de la actividad biológica in vitro de las variantes de IFN- β -1a	77
9.1.1 Actividad biológica antiviral	78
9.2 Análisis espectroscópico por Dicroísmo Circular (DC) en UV cercano y lejano	79
9.2.1 Espectroscopia de DC en UV cercano y lejano	79
10. EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD IN VIVO DE IFN-β-1a Y SUS VARIANTES DE-INMUNIZADAS	80
10.1 Plan de inmunización	80
10.2 Aislamiento de células esplénicas	81
10.3 Análisis de la respuesta inmune ex vivo de las células esplénicas incubadas con IFN- β -1a y sus variantes de-inmunizadas	82
10.4 Cuantificación de mIFN- γ en sobrenadantes de cultivo de células esplénicas mediante ELISA sándwich	82
10.5 Cuantificación de mIL-4 en sobrenadantes de cultivo de células esplénicas mediante ELISA sándwich	83
10.6 Índice de Estimulación	84
10.7 Cuantificación de anticuerpos totales α -IFN- β -a1 en plasma de ratones inmunizados con las distintas variantes de IFN- β -a1 mediante ELISA indirecto	85
10.8 Evaluación del título de anticuerpos neutralizantes contra las distintas variantes de IFN- β -1a en plasma de ratones por medio de ensayos de inhibición de la ABAV	86
11. EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD EX VIVO DE IFN-β-1a Y SUS VARIANTES DE-INMUNIZADAS	87
11.1 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humana	87
11.2 Análisis de la respuesta inmune celular en muestras de células mononucleares de sangre periférica humana (CMSP)	88
11.2.1 Ensayo de estimulación antigénica	88
11.2.2 Detección de marcadores celulares vinculados con la activación de linfocitos T mediante citometría de flujo	88
11.2.3 Ensayos de re-estimulación	89
Resultados	91
1. DESARROLLO DE VARIANTES DE-INMUNIZADAS DE IFN-β-1a MEDIANTE ALGORITMOS DE PREDICCIÓN IN SILICO	91
2. GENERACIÓN DE LAS VARIANTES DE-INMUNIZADAS DE IFN-β-1a	94
2.1 Construcción de los plásmidos pLV-PLK conteniendo las diferentes variantes de IFN- β -1a	94
2.2 Generación de líneas celulares productoras de las variantes de-inmunizadas de IFN- β -1a	96
3. PURIFICACIÓN DE LAS VARIANTES DE IFN-β MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE PSEUDO-AFINIDAD A COLORANTES Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)	97
3.1 Confirmación de la identidad de las variantes de IFN- β -1a purificadas mediante ensayos de Western Blot.	101
4. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL Y ANALÍTICA DE LAS VARIANTES DE-INMUNIZADAS DE IFN-β-1a	102
4.1 Valoración de la actividad biológica in vitro de las variantes de IFN- β -1a	102

4.2 Análisis de la estructura secundaria y terciaria de las variantes de IFN β -1a mediante Dicroísmo Circular (DC) en UV cercano y lejano	104
5. EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD IN VIVO DE IFN-β-1a Y SUS VARIANTES DE-INMUNIZADAS	105
5.1 Análisis de la respuesta inmune celular en ratones transgénicos HLA-DR3. Cuantificación de mIFN- γ y mL-4 en sobrenadantes de cultivo de células esplénicas estimuladas ex vivo con IFN- β -1a	106
5.2 Análisis de la respuesta inmune humoral: Evaluación del título de anticuerpos α - IFN- β -1a en plasma de ratones transgénicos inmunizados	108
6. EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD EX VIVO DE IFN-β-1a Y SUS VARIANTES DE-INMUNIZADAS	111
6.1 Análisis de la respuesta inmune celular en muestras de células mononucleares de sangre periférica humana (CMSP)	111
Discusión	118
1. DESARROLLO DE VARIANTES DE-INMUNIZADAS DE IFN- β -1a	120
2. PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE-INMUNIZADAS	122
3. EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE IFN- β -1a Y SUS VARIANTES DE-INMUNIZADAS	124
3.1 Análisis de la inmunogenicidad in vivo	125
3.2 Análisis de la inmunogenicidad ex vivo	127
Conclusiones	133
Bibliografía	136

Abreviaturas y Símbolos

A	absorbancia
AB	actividad biológica
ABAV	ensayos de valoración biológica antiviral
ABE	actividad biológica específica
ADA	anticuerpos anti-droga (<i>Anti-Drug antibodies</i>)
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNdc	ADN doble cadena
AIFA	Agencia Italiana del Medicamento
ARN	ácido ribonucleico
ARNasa	endorribonucleasa
ARNasa L	endorribonucleasa latente
Asn	asparagina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCR	receptor de superficie de linfocitos B
BHE	barrera hematoencefálica
BSA	albúmina sérica bovina
C	concentración de IFN
Can	concentración de ácido nucleico
CDc	células dendríticas convencionales
CDp	células dendríticas plasmocitoides
CE	células esplénicas
Cél.	células
CHO	línea celular de hámster chino establecida a partir de ovario
CLIP	péptido de la cadena invariante asociada a moléculas del CMH-II
CMH	complejo mayor de histocompatibilidad

CMH-I	complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I
CMH-II	complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II
CMSP	células mononucleares de sangre periférica
CMV	citomegalovirus
CPAs	células presentadoras de antígeno
CPOs	células precursoras de oligodendrocitos
Cys	cisteína
DC	dicroísmo circular
D-MEM	medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	dimetilsulfóxido
DO	densidad óptica
DS	desviación estándar
EAE	encefalomielitis autoinmune experimental
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ácido etilendiamino tetraacético
eIF2	factor de iniciación de la transcripción
ELISA	enzimoinmunoensayo
EM	Esclerosis múltiple
EMA	Agencia Europea de Medicamentos (<i>European Medicines Agency</i>)
EMRR	Esclerósis múltiple remitente-recurrente
Fc	fragmento constante de las inmunoglobulinas
FCN	factor de crecimiento nervioso
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU. (<i>Food and Drug Administration</i>)
Fig.	figura
FT	<i>flowthrough</i>
Fw	en sentido directo
gag	proteína de la cápside lentiviral

GM-CSF	factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
Ham's F12	fórmula 12 de Ham
HEK293	línea celular humana establecida a partir de riñón
hIFN	interferón humano
hIL-4	interleuquina 4 humana
His	histidina
HIV	virus de la inmunodeficiencia humana
HLA	moléculas humanas del CMH (<i>Human Leukocyte Antigen</i>)
HPLC	cromatografía líquida de alta eficiencia
ICAM	molécula de adhesión intercelular
IE	índice de estimulación
IFN	interferón
IFNAR	receptores de interferón
IFNAR-1	receptor de interferón-subunidad 1
IFNAR-2	receptor de interferón-subunidad 2
Ig	inmunoglobulina
IIRMI	impurezas que modulan la respuesta inmune innata
IL	interleuquina
IM	intramuscular
IRF	factor regulador de interferón
ISGF3	factor 3 de los genes estimulados por interferon
ISGs	genes estimulados por interferón
ISREs	elementos de respuesta estimulados por interferón
JAK	quinasa de Janus
LB	medio de cultivo Luria-Bertani
LFA-1	antígeno 1 asociado a la función del linfocito
li	cadena invariante

LTRs	repeticiones terminales largas
LV	lentivirus
mAb	anticuerpo monoclonal
MAPKs	proteínas quinasas activadas por mitógenos
MEM	medio esencial mínimo
MIA	marcadores inducidos por activación
mIFN- β	interferón beta de ratón
mIFN- γ	interferón gamma de ratón
mIL-4	interleuquina 4 de ratón
MMPs	metaloproteinasas de matriz
MOG	pool de péptidos de la glicoproteína mielina oligodendrocito
Mx	proteína de resistencia a myxovirus
NF- κ B	factor nuclear kappa B
NIBSC	<i>National Institute for Biological Standards and Control</i>
NK	células natural killer
NLR	receptores de tipo NOD
OAS	2'-5'-oligoadenilato sintetasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPD	o-fenilendiamina
pAb	anticuerpo policlonal
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PAMPs	patrones moleculares asociados a patógenos
pb	pares de bases
PBS	solución salina de fosfatos
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEG	polietilenglicol
Phe	fenilalanina

PI3K	fosfatidilinositol 3-quinasa
PKR	proteína quinasa R
pol	proteína polimerasa lentiviral
PRP	plasma rico en plaquetas
PRR	receptores de reconocimiento de patrones
PVDF	difluoruro de polivinilo
R	recuperación
RE	retículo endoplasmático
Rev	proteína lentiviral Rev
rhIFN	interferón humano recombinante
RLR	receptores de tipo RIG-I
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
Rv	en sentido reverso
SC	subcutáneo
SDS	dodecilsulfato de sodio
SEB	enterotoxina B de <i>Staphylococcus</i>
Ser	serina
SFB	suero fetal bovino
SNC	sistema nervioso central
STAT	transductor de señales y activador de la transcripción
SV40	virus símico 40
TAE	solución de Tris-acetato-EDTA
TBS	solución de Tris
TCR	receptor de superficie de los linfocitos T
Td	dependiente de lindofcitos T
TGF	factor de crecimiento transformante
Th	células T helper

Ti	independiente de linfocitos T
TIMP	inhibidor de metaloproteinasas
TLR	receptor de tipo Toll
TNF	factor de necrosis tumoral
Treg	células T reguladoras
Tris	tris-(hidroximetil)-aminoetano
Trp	triptófano
TT	toxina tetánica
Tween 20	polisorbato 20
TYK2	quinasa 2 dependiente de tirosina
UV	ultravioleta
VSV	virus de la estomatitis vesicular
WT	<i>wild type</i>
X	concentración de células
XM	concentración de células muertas
XT	concentración de células totales
XV	concentración de células viables
λ	longitud de onda

Resumen

El interferón beta 1a humano recombinante (rhIFN- β -1a) se ha utilizado ampliamente para el tratamiento de la esclerosis múltiple durante las últimas cuatro décadas. A pesar del origen humano de la secuencia del IFN- β , el mismo es inmunogénico, y respuestas inmunitarias no deseadas en pacientes tratados con rhIFN- β -1a pueden comprometer su eficacia y seguridad clínica. Tratamientos prolongados con rhIFN- β -1a pueden dar lugar a un quiebre de la tolerancia inmunológica frente a antígenos propios, con la consiguiente producción de anticuerpos anti-IFN. Al unirse a la citoquina, estos anticuerpos pueden provocar una alteración en la farmacocinética de la misma, inhibir su acción terapéutica o incluso inhibir a la citoquina autóloga. Por este motivo, el objetivo del presente trabajo se centró en el análisis de la inmunogenicidad de rhIFN- β -1a y en el desarrollo de nuevas variantes con inmunogenicidad reducida, sin producir un impacto negativo en su estructura y función biológica, apuntando a diseñar un candidato terapéutico mejorado en cuanto a su antigenicidad/inmunogenicidad y actividad biológica *in vitro*, como posible candidato a *biobetter*.

En este estudio, mediante la aplicación del método DeFT (del inglés, De-immunization of Functional Therapeutics) se llevó a cabo un procedimiento de de-inmunización, empleando herramientas de predicción *in silico* que permitieron identificar las regiones potencialmente inmunogénicas en la secuencia del IFN- β -1a, así como los cambios puntuales que conducirían a la reducción de su inmunogenicidad global, evitando alterar la estructura y función de la proteína. Estas modificaciones fueron introducidas en distintas combinaciones, generando dos variantes de-inmunizadas de IFN- β -1a en células CHO, y se designaron como IFN- β -1a(VAR1) e IFN- β -1a(VAR2). Primero, se analizaron las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas mediante espectroscopia de dicroísmo circular. Luego, se realizaron ensayos para evaluar su funcionalidad. Mientras que IFN- β -1a(VAR2) mostró una actividad antiviral *in vitro* similar a la de la proteína original, IFN- β -1a(VAR1) exhibió una potencia biológica un 40% mayor. Ensayos *in vivo* utilizando ratones transgénicos HLA-DR revelaron que las variantes de-inmunizadas mostraron una inmunogenicidad marcadamente reducida. En línea con estos resultados, ambas muteínas exhibieron una inmunogenicidad *ex vivo* inferior en comparación con la proteína original.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis, se puede concluir que las variantes de-inmunizadas del rhIFN- β -1a desarrolladas presentan características únicas desde el punto de vista de su inmunogenicidad y actividad biológica, lo cual las posiciona como candidatos terapéuticos muy promisorios para el tratamiento de la esclerosis múltiple.

Abstract

Recombinant human interferon beta 1a (rhIFN- β -1a) has been widely used to treat multiple sclerosis for the last four decades. Despite the human origin of the IFN- β sequence, it is immunogenic, and unwanted immune responses in IFN- β -treated patients may compromise its efficacy and safety in the clinic. Prolonged treatment with rhIFN- β -1a may lead to an immune tolerance breakdown to self-antigens, resulting in the production of anti-IFN antibodies. When these antibodies bind to the cytokine, they can alter its pharmacokinetics, inhibit its therapeutic action or even inhibit the autologous cytokine. For this reason, the objective of this study was to analyze the rhIFN- β -1a immunogenicity and develop new variants with reduced immunogenicity without negatively impacting its structure and biological function, aiming to design an improved therapeutic candidate in terms of antigenicity/immunogenicity and *in vitro* biological activity, as a possible biobetter candidate.

In this study, the DeFT (De-immunization of Functional Therapeutics) method was applied to carry out a de-immunization procedure, using *in silico* prediction tools to identify potentially immunogenic regions in the IFN- β -1a sequence, as well as specific changes that would lead to a reduction in its overall immunogenicity while avoiding alterations in the protein's structure and function. These modifications were introduced in various combinations, generating two de-immunized variants of IFN- β -1a in CHO cells, designated as IFN- β -1a(VAR1) and IFN- β -1a(VAR2). First, the secondary and tertiary structures of the proteins were analyzed using circular dichroism spectroscopy. Then, functionality assays were conducted. While IFN- β -1a(VAR2) showed similar *in vitro* antiviral activity to the original protein, IFN- β -1a(VAR1) exhibited 40% greater biological potency. *In vivo* assays using HLA-DR transgenic mice revealed that the de-immunized variants showed markedly reduced immunogenicity. Accordingly, both muteins evidenced significantly lower *ex vivo* immunogenicity than the original molecule.

Based on the results obtained in this study, it can be concluded that the de-immunized variants of rhIFN- β -1a developed here have unique characteristics in terms of immunogenicity and biological activity, positioning them as up-and-coming therapeutic candidates for the treatment of multiple sclerosis.

Introducción

1. PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE USO TERAPÉUTICO

En las últimas dos décadas, los medicamentos biotecnológicos, comúnmente denominados “*biológicos*”, han revolucionado la terapia de los pacientes, no sólo en el tratamiento de las deficiencias hormonales y las neoplasias malignas sólidas y hematológicas, sino también frente a enfermedades inflamatorias mediadas por el sistema inmunológico, convirtiéndose en medicamentos clave para los sistemas de salud en todo el mundo. El vencimiento de las protecciones de datos o patentes que protegen a los productos biofarmacéuticos, ha permitido el desarrollo y aprobación de varios medicamentos biosimilares para su uso en diferentes condiciones clínicas. Los términos “bioterapéutico” en general y “biosimilar” en particular, fueron introducidos por primera vez por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) para describir los medicamentos biológicos desarrollados como “copias” de los biológicos innovadores (comúnmente denominados originadores). Sin embargo, a diferencia de los productos genéricos de medicamentos de moléculas pequeñas, no se pueden obtener copias idénticas de los biológicos. Esta limitación depende principalmente del hecho de que los biológicos son producidos por sistemas celulares vivos, cuyos procesos biosintéticos están sujetos a factores intrínsecos e inevitables de variabilidad biológica y, en parte, de su alto grado de complejidad en términos de estructura molecular y procedimientos de fabricación (1).

A pesar de reconocer el potencial impacto favorable de los bioterapéuticos originadores y biosimilares en el mercado farmacéutico, tanto en términos de ahorro de costos como de accesibilidad a medicamentos, la Agencia Italiana del Medicamento (AIFA) ha adoptado la posición de que los originadores y los biosimilares no pueden considerarse como productos medicinales intercambiables, excluyendo así la práctica de sustitución automática y cambio y, de acuerdo con el concepto de biosimilitud emitido por la EMA, enfatizando el principio del papel dominante de los clínicos en la decisión de si los pacientes deben ser prescritos con un originador o su biosimilar. Tanto la EMA como la Organización Mundial de la Salud (OMS) han estado activamente involucradas en este trabajo y en la promoción de la convergencia global de enfoques regulatorios para asegurar la calidad, seguridad y eficacia de los bioterapéuticos innovadores y biosimilares a nivel mundial (2).

En los últimos 30 años, los avances en biología molecular han permitido identificar, modificar y transferir genes que codifican proteínas biológicamente activas naturales de un organismo a otro para obtener una síntesis altamente eficiente de sus productos. Esto ha llevado

a la producción de medicamentos biológicos preparados mediante tecnología de ADN recombinante (ADNr), utilizando una variedad de sistemas de expresión, tales como bacterias, levaduras, líneas celulares transformadas de origen animal, células de insectos y plantas, animales transgénicos y plantas completas. La tecnología de ADNr también se usa para producir proteínas biológicamente activas que no existen en la naturaleza, como anticuerpos monoclonales (mAbs) quiméricos, humanizados o totalmente humanos, o proteínas relacionadas con anticuerpos u otros medicamentos biológicos diseñados, como proteínas de fusión, interferones naturales, hormonas y enzimas naturales modificadas. En este sentido, dependiendo de las condiciones de crecimiento y otros factores, se pueden generar mezclas de moléculas relacionadas que son bastante difíciles de extraer, purificar y caracterizar. Incluso con acceso a la secuencia exacta de ADN que codifica el biológico originador, es muy difícil replicar exactamente su estructura final (es decir, las estructuras terciaria y cuaternaria), incluidos los cambios postraduccionales, como la glicosilación, y reproducir exactamente el proceso de fabricación. En consecuencia, cada bioterapéutico, aunque sea muy similar al originador de referencia, nunca alcanzará el nivel de identidad exacta. Desde los primeros días de la biotecnología, también se ha logrado un gran progreso en la capacidad de purificar macromoléculas biológicamente activas y, especialmente, en las técnicas analíticas utilizadas para su caracterización. Actualmente, los componentes de proteínas, lípidos y carbohidratos de las macromoléculas biológicas se pueden caracterizar en gran detalle. Sin embargo, aún no es posible predecir completamente las propiedades biológicas y la eficacia clínica de estas macromoléculas biológicas únicamente basándose en sus características físico-químicas (3).

Los bioterapéuticos originadores y biosimilares de segunda generación (es decir, anticuerpos monoclonales, proteínas generadas por la fusión de anticuerpos y dominios de receptores o proteínas nativas modificadas, entre otras) difieren en varios aspectos en comparación con los de primera generación (por ejemplo, epoetinas, factores estimulantes de la médula ósea, somatotropinas). En este sentido, dado que los bioterapéuticos originadores y biosimilares de segunda generación presentan una mayor complejidad estructural y molecular, lo que podría traducirse en una serie de problemas farmacológicos y terapéuticos, plantean nuevos desafíos para los fabricantes y las autoridades regulatorias. El camino regulatorio para los fármacos introducidos en el mercado europeo hace una década ha sido tomado como referencia por otras autoridades regulatorias, incluyendo la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU. (FDA). De acuerdo con dicho camino, una vez que se genera un producto biológico y se pretende que sea altamente similar a un originador, la similitud debe ser demostrada tanto en estudios no clínicos (es decir, pruebas *in vitro* y en animales) como en estudios clínicos. El diseño de estos estudios por parte del propietario del bioterapéutico suele

estar sujeto a una discusión preliminar y acuerdo con las autoridades regulatorias, como la EMA o la FDA. En todos los casos, el principio general subyacente al procedimiento de aprobación es que cuanto mayor sea el nivel de similitud, en términos de propiedades estructurales y biológicas/farmacológicas *in vitro*, menor será la evidencia clínica necesaria para demostrar la similitud clínica (1, 3).

2. INTERFERONES COMO CITOQUINAS Y BIOTERAPÉUTICOS

En 1957, Isaacs y Lindenmann descubrieron una sustancia que protegía a las células de la infección viral, a la que llamaron interferón (IFN). Los IFNs son proteínas con actividad antiviral que son secretadas por las células en respuesta a una variedad de estímulos. Los IFNs (Tipo I y Tipo II) fueron las primeras citoquinas descubiertas y proporcionaron una base fundamental para comenzar a entender las funciones, vías, evolución y estructura de otras citoquinas de Clase II y sus receptores, y fueron los primeros en ser utilizados terapéuticamente. Los IFNs y las primeras citoquinas descubiertas, clonadas, purificadas y caracterizadas fueron identificados mediante metodologías laboriosas antes de que los bancos de secuencias de ADN y los genomas completos de humanos y otros organismos estuvieran disponibles (4).

Los interferones son citoquinas secretadas de forma autócrina y parácrina por las células huésped en respuesta a patógenos, fundamentalmente virus, y productos microbianos como endotoxinas, piranos y polirribonucleótidos de doble cadena, entre otras. Generalmente, están compuestos por cadenas aminoacídicas de 130 a 170 aminoácidos, con un peso molecular variable entre 20 y 100kD. Al igual que la mayoría de las proteínas, son sensibles a enzimas proteolíticas y al calor, aunque relativamente estables a valores bajos de pH. Esencialmente, la función de los IFNs consiste en aumentar la transcripción de cientos de genes estimulados por IFN (ISGs, del inglés *Interferon-Stimulated Genes*) cuyos productos cumplen un rol primordial en la respuesta inmune innata y adaptativa frente a infecciones virales, produciendo además profundos cambios metabólicos (5).

La transcripción de los genes que codifican para los distintos tipos de IFNs en la célula huésped, que normalmente se encuentra silenciada, es inducida en respuesta a infecciones por medio de la unión de diferentes factores de transcripción a sus promotores. Luego de su unión al receptor de alta afinidad, localizado en el exterior de las superficies celulares, este grupo de proteínas desempeña importantes funciones en la comunicación intercelular, estimulando vías de señalización intracelulares e intercelulares involucradas en la resistencia a infecciones virales, el desarrollo de la respuesta inmune innata y adaptativa y la modulación del crecimiento, la diferenciación celular y la apoptosis (6).

2.1 Clasificación y nomenclatura de los interferones

Los IFNs se dividen en tres familias (tipo I, tipo II y tipo III) en función de la homología de sus secuencias, las cuales corresponden a la relación evolutiva, el uso de receptores y la actividad funcional de estas citoquinas (7).

Los IFNs de tipo I se componen de siete clases: IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- ω , IFN- δ y IFN- τ . Fueron identificados originalmente en base a su actividad antiviral, pero posteriormente se reconoció que también tienen actividades antiproliferativas e inmunomodulatorias, así como roles en la modulación de infecciones por patógenos no virales (4, 7). La familia de IFNs de tipo II incluye un único miembro, el IFN- γ , que tiene funciones proinflamatorias e inmunomoduladoras que son distintas de las de los IFNs de tipo I y III. Se destaca por su capacidad para modular la respuesta inmunitaria, tanto innata como adaptativa, y por inducir la activación de macrófagos. Es producido principalmente por células del sistema inmune (linfocitos T activados, células *natural killer* (NK) y macrófagos) y, a diferencia del resto de los IFNs, su acción es mediada a través de la formación de un homodímero (8). Fue casi 50 años después que se descubrieron los IFNs de tipo III y se componen por IFN- λ 1, IFN- λ 2 e IFN- λ 3 (9) (o IL-28A, IL-28B e IL-29, respectivamente (10)), y en un principio no estaba claro por qué el organismo mantendría vías de defensa antiviral aparentemente redundantes. Aunque los IFNs de tipo I y tipo III son genéticamente distintos y utilizan receptores diferentes, son inducidos por vías similares de detección de patógenos y activan programas relacionados de expresión génica antiviral, antiproliferativa e inmunomoduladora. En un principio se reconoció el potencial de los IFNs de tipo III para proporcionar una protección antiviral suplementaria en las superficies epiteliales, pero ahora se cree que los IFNs de tipo III podrían proporcionar una defensa de primera línea que conlleva menos daño colateral que la respuesta más potente de los IFNs de tipo I. Este modelo de acción de los IFNs de tipo III surge de una mejor comprensión de las células y tejidos en los que los IFNs de tipo III ejercen su actividad. En efecto, se ha descubierto que los IFN- λ cumplen un rol fundamental en la inmunidad de mucosas (7).

2.2 Interferones humanos (hIFNs) tipo I

Los interferones humanos tipo I incluyen 13 hIFN- α similares con un 80% de homología, y un solo hIFN- β , hIFN- ϵ , hIFN- κ y hIFN- ω con una menor homología (30-50%). Todos los hIFNs tipo I actúan a través de un receptor heterodimérico compartido, IFNAR, compuesto por las subunidades IFNAR1 e IFNAR2, ubicuamente expresadas en la mayoría de los tejidos y tipos celulares. Los hIFNs de tipo I se unen a IFNAR2 con alta afinidad, y luego reclutan a IFNAR1 de

baja afinidad, creando un complejo ternario competente para la señalización. Los genes de los hIFNs de tipo I carecen de intrones (excepto el hIFN- κ , que tiene uno) y están agrupados en el cromosoma 9. Aunque existe una considerable redundancia entre los hIFNs de tipo I, las diferencias en las secuencias de los promotores y en las propiedades bioquímicas contribuyen a actividades funcionales distintas (11).

2.3 Síntesis de los hIFNs tipo I

La producción de hIFNs de tipo I puede ser inducida, dependiendo del tipo de estímulo, en un amplio rango de tipos celulares, siendo las células dendríticas plasmocitoides la mayor fuente de IFNs de tipo I. En el contexto de una infección viral, el primer paso para dar lugar a una respuesta inmunitaria consiste en el reconocimiento de componentes virales o patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) por células de la inmunidad innata, mediante receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Este reconocimiento activa la familia de factores de transcripción del factor regulador de interferón (IRF). La producción de hIFNs de tipo I es transitoria, y requiere de una estimulación, por lo general por parte de los ácidos nucleicos víricos, que son reconocidos en el citosol celular o en el compartimento endosómico. Éstos se unen a distintos tipos de PRR intracelulares pertenecientes a distintas familias de receptores: de tipo Toll (TLR), de tipo RIG-I (RLR) y de tipo NOD (NLR). La interacción entre un determinado PRR y su ligando conduce al reclutamiento de proteínas quinasas específicas encargadas de fosforilar y activar determinados factores de transcripción. Estos factores, una vez fosforilados, se trasladan al núcleo celular e interaccionan con factores de transcripción específicos para promover inicialmente la transcripción de hIFN- β y posteriormente la transcripción de varios subtipos de hIFN- α (12, 13).

2.4 Funciones de los hIFNs tipo I

Los hIFNs son polipéptidos secretados por células infectadas y tienen tres funciones principales. Primero, inducen estados antimicrobianos intrínsecos en las células infectadas y vecinas que limitan la propagación de agentes infecciosos, particularmente patógenos virales. Segundo, modulan las respuestas inmunitarias innatas de manera equilibrada, promoviendo la presentación de antígenos y las funciones de las células NK mientras restringen las vías proinflamatorias y la producción de citoquinas. Tercero, activan el sistema inmunológico adaptativo, promoviendo así el desarrollo de respuestas de células T y B específicas de alta afinidad y memoria inmunológica (Figura 1). Los hIFNs tipo I son protectores en infecciones

virales agudas, pero pueden tener roles tanto protectores como perjudiciales en infecciones bacterianas y enfermedades autoinmunes (14).

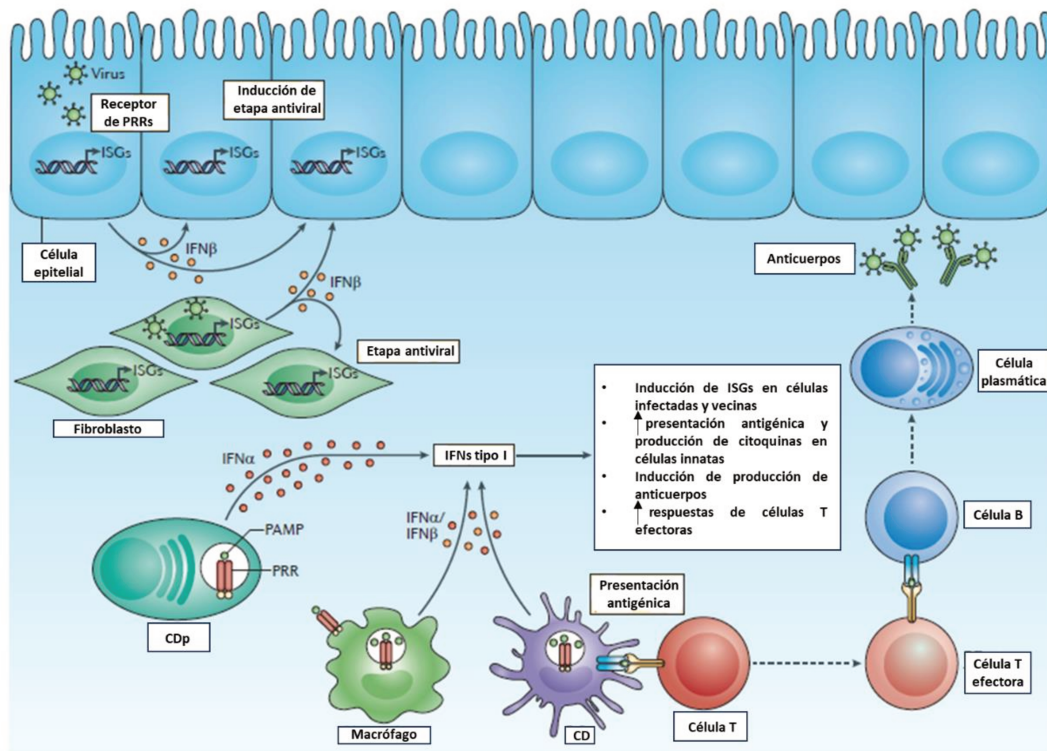


Fig. 1: El interferón tipo I controla la inmunidad innata y adaptativa y los programas antimicrobianos intracelulares: Al detectar patógenos, las células infectadas producen interferones tipo I (IFNs). Las células inmunitarias innatas, como los macrófagos y las células dendríticas (CD), producen IFNs tipo I después de detectar componentes del patógeno utilizando diversos receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), que se encuentran en la membrana plasmática, en los endosomas y a lo largo del citosol. En particular, las CD plasmocitoides producen grandes cantidades de IFN- α . Las células no inmunitarias, como los fibroblastos y las células epiteliales, producen predominantemente IFN- β . En las células infectadas y en las vecinas, los IFNs tipo I inducen la expresión de genes estimulados por IFN (ISGs), cuyos productos inician un programa antimicrobiano intracelular que limita la propagación de los agentes infecciosos. Las células inmunitarias innatas también responden a los IFNs tipo I al mejorar la presentación de antígenos y la producción de mediadores de la respuesta inmune, como citoquinas y quimioquinas. La inmunidad adaptativa también se ve afectada por los IFNs tipo I: por ejemplo, los IFNs tipo I pueden aumentar la producción de anticuerpos por las células B y amplificar la función efectora de las células T. PAMP, patrón molecular asociado a patógenos. Adaptado de Ivashkiv y Donlin (14).

La función de los hIFN de tipo I se desencadena a partir de una serie de cascadas de señalización intracelulares que dan lugar a múltiples funciones inmunológicas, afectando distintos procesos celulares como la proliferación, diferenciación, activación, migración y apoptosis, entre otros.

En la vía canónica de señalización, conocida como vía JAK-STAT (vía de la quinasa de Janus, JAK, y el transductor de señales y activador de la transcripción, STAT) la unión del hIFN de tipo I desencadena la dimerización del complejo receptor heterodimérico IFNAR, lo que promueve la fosforilación de las quinasas de la familia de Janus, JAK1 y TYK2, activándolas. Luego, JAK1 y TYK2 reclutan y activan a las proteínas STAT1 y STAT2, lo cual resulta en su dimerización y reclutamiento del factor de regulación de IFN γ (IRF9). Estas tres proteínas forman el complejo ternario ISGF3, capaz de translocar al núcleo celular donde se unen a elementos de respuesta estimulados por IFN (ISREs) del ADN y median la expresión de diferentes genes estimulados por IFN (ISGs), involucrados en el desarrollo de respuestas antivirales, proinflamatorias e inmunomoduladoras (Figura 2). Adicionalmente, por medio de la vía no canónica de señalización, la unión de los hIFN de tipo I es capaz de inducir la expresión de los ISGs a partir de la activación de otras proteínas STAT (como STAT 3, 5 y 6) o mediante la vía de las quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) o la vía del fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) (14, 15).

Una de las funciones de los hIFNs de tipo I consiste en mediar la acción antiviral por medio de la inhibición del ciclo del virión, promoviendo la síntesis de enzimas que interfieran con el transporte de la partícula vírica, con la transcripción y replicación de su material genético o con la traducción del ARN viral.

Entre estas enzimas se encuentran:

- » La proteína quinasa dependiente de ARN bicatenario (PKR) inducida por IFN-(α/β), la cual provoca, entre otras acciones, la fosforilación e inactivación de la subunidad α del factor de iniciación de la transcripción eIF2, promoviendo el bloqueo de la síntesis de proteínas e inhibición de la replicación viral (16).

- » La 2'-5' oligoadenilatosintetasa (OAS) es otra enzima inducida por IFN-(α/β) y también activada por ARN bicatenario. Cuando se activa, cataliza la síntesis de 2'-5' oligoadenilatos encargados de la activación de una ARNasa latente (ARNasa L) que degrada el ARN, inhibiendo así la replicación viral. Por otra parte, el sistema OAS-ARNasa L puede conducir a la apoptosis de las células infectadas.

- » La adenosindesaminasa específica de ARN (ADAR), cuyo gen codificante es inducido transcripcionalmente. Esta enzima modifica las secuencias del ARN celular y viral, incrementando el número de proteínas mutadas en las células infectadas.

- » Las proteínas Mx (con actividad GTPasa, enzima fosforilasa que hidroliza GTP), que no están presentes constitutivamente en las células normales, son también inducidas por hIFN-(α/β) y poseen actividad antiviral contra un amplio rango de virus con genoma ARN al interactuar con las nucleocápsides virales e inhibir su transporte o alterar sus propiedades (12, 14).

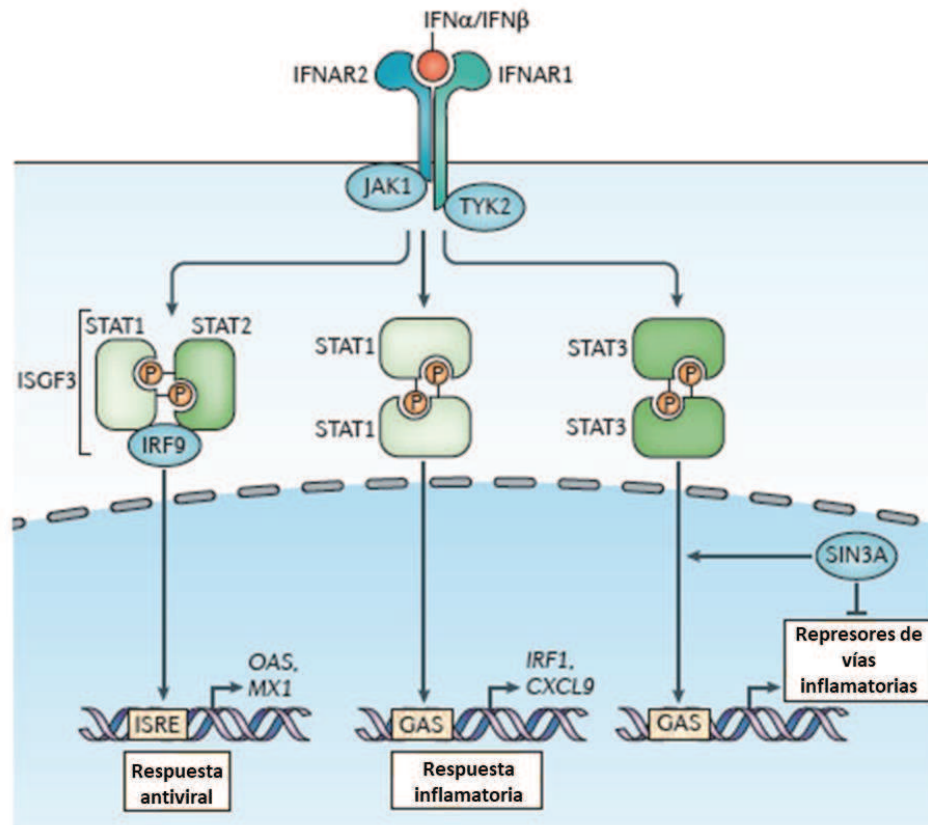


Fig. 2: La vía de señalización canónica del interferón tipo I. Al unirse, el receptor de interferón- α (IFNAR, que está compuesto por las subunidades IFNAR1 e IFNAR2) activa la quinasa Janus 1 (JAK1) y la quinasa de tirosina 2 (TYK2). La fosforilación del receptor por estas quinasas resulta en el reclutamiento de las proteínas de transducción de señales y activador de la transcripción (STAT), su fosforilación, dimerización y translocación nuclear. Los tres complejos STAT predominantes que se forman en respuesta al interferón tipo I (IFN) controlan distintos programas de expresión génica. El complejo de genes estimulados por interferón factor 3 (ISGF3) (que está compuesto por STAT1, STAT2 e IRF9) se une a los elementos de respuesta estimulados por IFN (ISRE) para activar genes antivirales clásicos, mientras que los homodímeros de STAT1 se unen a secuencias activadas por gamma (GAS) para inducir genes proinflamatorios. Los homodímeros de STAT3 suprimen indirectamente la expresión de genes proinflamatorios, probablemente mediante la inducción de represores transcripcionales aún desconocidos. STAT3 activado por IFN tipo I se une al complejo co-represor SIN3 (SIN3A), que suprime la inducción de los genes *targets* directos de STAT3 al promover la desacetilación de STAT3 y de las histonas. Los IFNs tipo I también activan STAT4 y pueden activar STAT5 y STAT6 de manera dependiente del contexto (no representado). CXCL9, ligando de quimioquina CXC 9; MX1, proteína Mx1 de unión a GTP inducida por IFN; OAS, 2'-5' oligoadenilatosintetasa; P, fosfato. Adaptado de Ivashkiv y Donlin (14).

Los hIFNs de tipo I también median una poderosa acción inmunomoduladora tendiente a promover una efectiva respuesta inmunitaria antiviral. Favorecen la activación de macrófagos y células NK, potenciando su actividad citotóxica; ayudan a promover el desarrollo de la respuesta adaptativa al incrementar la expresión de las moléculas de clase I y II del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), junto a otros componentes involucrados en la presentación antigénica a linfocitos T. En conjunto, esto mejora la eficiencia de eliminación de

las células infectadas mediada por los linfocitos T citotóxicos. Además, los hIFNs de tipo I favorecen el secuestro de linfocitos en los ganglios linfáticos, lo cual promueve su activación y actúan de manera directa sobre los linfocitos T y B, guiando la progresión de la respuesta antiviral (12, 14).

3. IFN- β HUMANO (hIFN- β)

El hIFN- β es una citoquina producida de manera natural por el sistema inmunológico en respuesta a estímulos biológicos y químicos. Como los demás IFNs tipo I, actúa uniéndose al receptor heterodimérico IFNAR, y regula la expresión de una gran cantidad de genes a través de las vías clásicas JAK/STAT y otras vías. El hIFN- β es pleiotrópico, ya que induce actividades antivirales, antiproliferativas e inmunomoduladoras en numerosos tipos de células y es por esto que se lo utiliza para tratar diversas enfermedades, como la infección por hepatitis C y la esclerosis múltiple (EM) (17).

En la actualidad, existen diferentes versiones de hIFN- β recombinante (rhIFN- β) disponibles comercialmente para el tratamiento de diversas enfermedades. En particular, hay dos que se emplean como bioterapéuticos: rhIFN- β -1a, producido en células de ovario de hámster chino (CHO), con una secuencia de aminoácidos idéntica y patrones de glicosilación similares a los de la proteína humana endógena (18); y rhIFN- β -1b, producido en *Escherichia coli* y que es, por lo tanto, no glicosilado y carece de la metionina N-terminal y tiene una Ser-17 en lugar de Cys-17 en comparación con la proteína humana natural (19). Las diferencias entre IFN- β -1a y 1b tienen consecuencias importantes en la inmunogenicidad y actividad biológica relativa, siendo IFN- β -1b más inmunogénico y aproximadamente 10 veces menos activo que las preparaciones de IFN- β -1a. Se ha demostrado que la mayor inmunogenicidad (posiblemente debido a la formación de agregados) y la menor actividad de IFN- β -1b están relacionadas con la falta de glicosilación y no con los cambios de secuencia. El IFN- β -1a está glicosilado en la asparagina ubicada en la posición 80 y esto ayuda a estabilizar la estructura y evita la exposición de una región relativamente hidrofóbica de la molécula. Se ha estudiado que la de-glicosilación de IFN- β -1a conduce a la producción de agregados (una mezcla de complejos con enlaces disulfuro) y pérdida de actividad. Estos agregados se han asociado fuertemente con la inducción de respuestas inmunes, y las regiones propensas a la agregación también pueden contener epítopes reconocidos por células T y células B (20).

3.1 Estructura molecular del hIFN- β

Diversos estudios han demostrado que la estructura de los interferones está estrechamente relacionada con su actividad (21), y las estructuras cristalográficas por rayos X del IFN- β murino (mIFN- β), del hIFN- α y del hIFN- β humano muestran una elevada homología estructural (22).

El hIFN- β es una proteína glicosilada de aproximadamente 20KDa, con 166 aminoácidos, y presenta un 50% de homología estructural con el mIFN- β y 35% con el hIFN- α . La conformación general del hIFN- β es similar a la de muchas otras citoquinas, como el hIFN- α , IL-2, IL-4 y la hormona de crecimiento humano (HGH) (17).

La estructura cristalina del IFN- β -1a (Figura 3) muestra una forma aproximadamente cilíndrica compuesta por cinco α -hélices (A–E). Los residuos de aminoácidos 2–22, 51–71, 80–107, 118–136 y 139–162 se etiquetan como hélices A, B, C, D y E, respectivamente. Las hélices A y B son paralelas, mientras que las hélices C y D corren en orientación antiparalela. La hélice D es una hélice más pequeña, que forma parte del largo lazo de unión entre las hélices C y E. El lazo AB es un lazo largo que conecta las hélices A y B, y se divide estructuralmente en tres partes: AB1, AB2 y AB3 (23). Hay varios residuos hidrofóbicos, como Phe-70, Phe-154, Trp-79 y Trp-143, que están involucrados en interacciones entre sí que estabilizan el núcleo de la molécula. Además, los residuos del núcleo forman varios enlaces de hidrógeno entre sí (24).

Como ya se citó, IFN- β -1a está además glicosilado en la Asn-80 de la hélice C. La glicosilación reduce la tendencia de la proteína a agregarse y aumenta la estabilidad y solubilidad de la misma. De hecho, la ausencia de carbohidratos en la estructura del IFN- β -1b aumenta la susceptibilidad de esta proteína a la agregación (25).

Finalmente, IFN- β -1a es un dímero asociado a zinc en la matriz cristalina. El dímero es una unidad asimétrica que consta de dos subunidades: A y B, con un átomo de zinc en la interfaz entre His-121 de la subunidad A y His-97 de la subunidad B (23) (24). La estructura dimérica probablemente sea un artefacto cristalográfico, ya que en solución IFN- β -1a es predominantemente monomérico, y en el complejo ternario de IFN β -1a/IFNAR1/IFNAR2 solo se encuentra una única molécula de IFN β -1a. Sin embargo, algunos autores sostienen que la unidad funcional del IFN- β parece estar cerca de un dímero (26, 27).

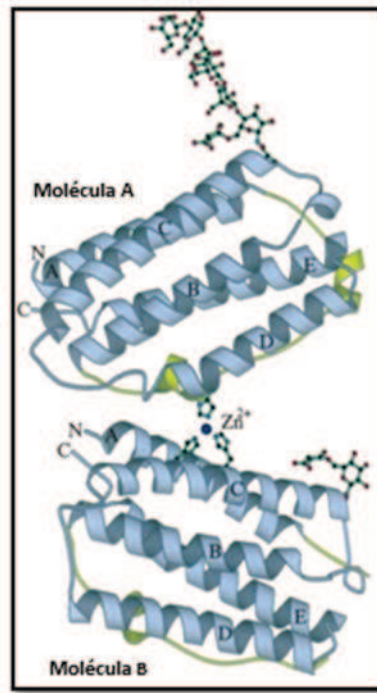


Fig. 3: Representación esquemática del dímero cristalográfico de hIFN-β a una resolución de 2.2 Å. Se muestra la porción modelada de los carbohidratos y parte del sitio de unión al zinc. La esfera corresponde al ion zinc. Las hélices y los extremos N y C están etiquetados. El lazo AB está representado en color verde. Adaptado de Karpusas y colaboradores (23).

3.2 hIFN-β-1a como bioterapéutico para la Esclerosis Múltiple

Desde el primer informe sobre el uso intratecal de IFN por Jacobs y colaboradores (28) y la aprobación del IFN-β-1b (Betaseron/Betaferon (Schering y Berlex Laboratories)) en 1993, las terapias con IFN-β se convirtieron en la primera clase importante de medicamentos desarrollados para su uso en la EM. Productos adicionales basados en IFN-β, incluidos el IFN-β-1a intramuscular (IM) (Avonex, Biogen), el IFN-β-1a subcutáneo (SC) (Rebif, EMD Serono) y el IFN-β-1a PEGilado (PEGIFN) (Plegridy, Biogen), entre otros, han ampliado el repertorio de medicamentos basados en IFN-β aprobados por la FDA. Aunque los IFNs solo atenúan parcialmente la tasa de recaídas y ralentizan la progresión de la enfermedad, han abierto una nueva era de intervenciones terapéuticas que ha remodelado la historia natural de la enfermedad. El entorno inmunológico complejo y heterogéneo del proceso de la enfermedad de la EM puede explicar la eficacia parcial de los IFN-β en un subconjunto de pacientes. Por lo tanto, una mejor comprensión de la fisiopatología de la enfermedad y de las vías de señalización mediadas por IFN-β conducirá, en última instancia, a decisiones de tratamiento más efectivas y seguras (29).

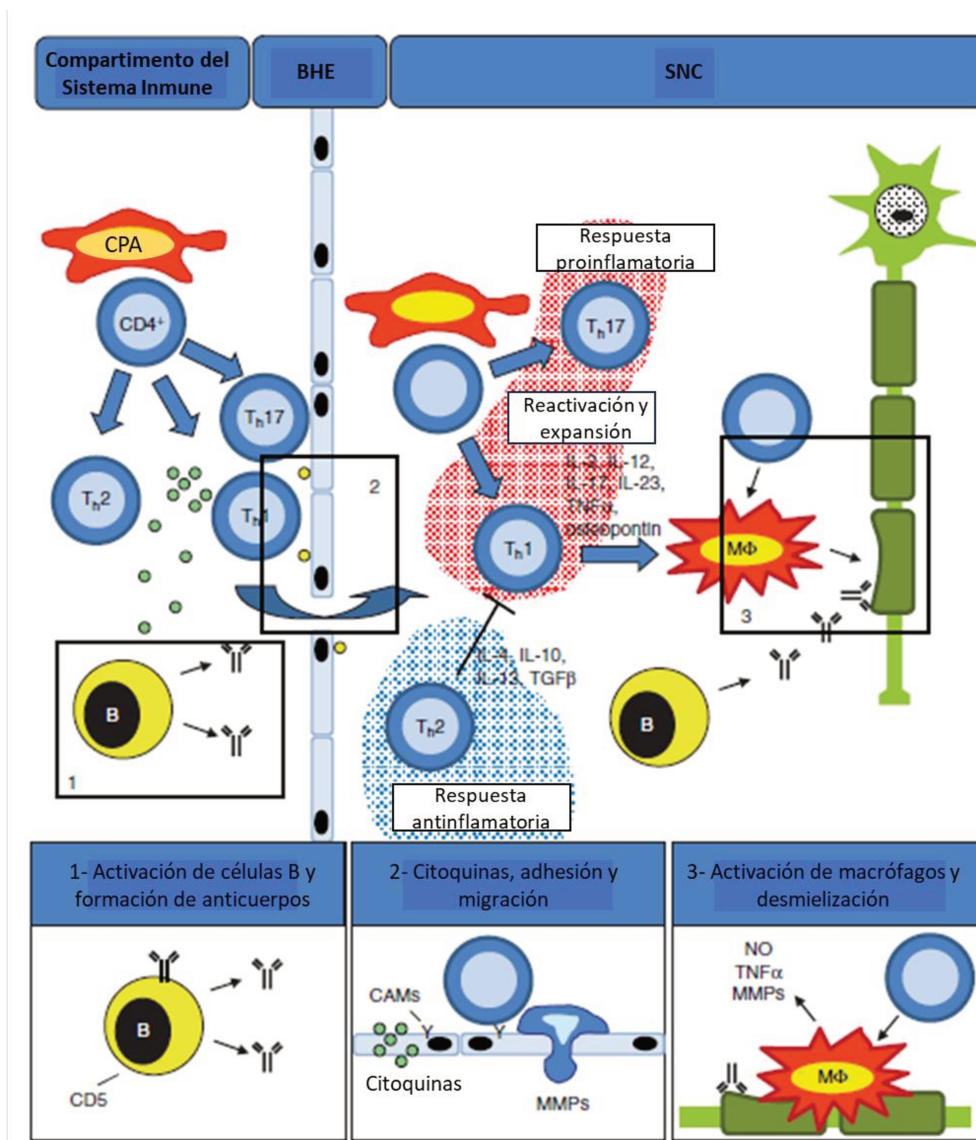
La EM es un trastorno inflamatorio autoinmune caracterizado por la desmielinización, inflamación y formación de lesiones focales en el Sistema Nervioso Central (SNC) (30). Según un estudio reportado en el año 2020, se estima que en la actualidad esta enfermedad afecta a 2.800.000 personas en todo el mundo (31). La enfermedad se manifiesta principalmente en adultos jóvenes, particularmente en mujeres, con una edad promedio de 29 años. Aunque existen varios cursos de la enfermedad, la mayoría de los pacientes son diagnosticados con EM remitente-recurrente (EMRR).

3.2.1 Patogénesis de la EM

Aunque la causa precisa de la EM sigue siendo incierta, las evidencias sugieren que uno o más desencadenantes ambientales y genéticos pueden inducir la activación de varios tipos de células inmunitarias (por ejemplo, poblaciones de células T o B autorreactivas) que responden a antígenos proteicos estructuralmente similares a la mielina del SNC. Estas células autoinmunes atraviesan la barrera hematoencefálica (BHE), lo que lleva a una desmielinización inflamatoria, pérdida de oligodendrocitos y daño axonal, que se manifiestan en síntomas clínicos de recaídas y discapacidad (30).

Investigaciones recientes utilizando un modelo animal de EM, la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) (32), sugieren que la enfermedad es mediada inmunológicamente. Según esta perspectiva, las células T autorreactivas específicas para la mielina, principalmente las células Th1, son los principales impulsores de la patogénesis de la enfermedad. Las células presentadoras de antígenos (CPA) activan estas poblaciones de células Th1, que posteriormente liberan citoquinas proinflamatorias, como la interleucina 1 (IL-1), el IFN- γ y el factor de necrosis tumoral (TNF). Estas citoquinas promueven la regulación ascendente de moléculas de adhesión y sus ligandos en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica y en los linfocitos. Esta acción permite que las células T autorreactivas se adhieran a las células endoteliales en la BHE. Las células T unidas secretan diversas metaloproteinasas de matriz (MMPs), que comprometen la integridad de la BHE y permiten que otros leucocitos activados infiltren el SNC. Esta fase del proceso se caracteriza por la primera aparición de lesiones. A medida que las células inmunitarias ingresan al SNC, los procesos inmunorreactivos continúan, ya que las células T activadas secretan citoquinas y quimiocinas proinflamatorias adicionales, que activan otras células inflamatorias del SNC, incluyendo monocitos y macrófagos. Los macrófagos activados desmielinizan los axones a través de múltiples mecanismos, que pueden incluir la fagocitosis mediada por Fc (fragmento constante

de las inmunoglobulinas) y la liberación de sustancias mielintóxicas (como radicales libres, glutamato, óxido nítrico (NO) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α)). También puede ser evidente el daño mediado por anticuerpos dependientes del complemento, junto con el daño a los oligodendrocitos y la axolema mediado por células T CD8⁺. Estas múltiples acciones inflamatorias pueden llevar con el tiempo a la pérdida axonal, un marcador de discapacidad irreversible. Sin embargo, estos procesos proinflamatorios pueden ser regulados negativamente mediante un cambio en las citoquinas mediado por células T reguladoras (Treg) y células Th2, en el que la liberación de citoquinas anti-inflamatorias como IL-4, IL-10 y factor de crecimiento transformante β (TGF- β) puede llevar a la desactivación de los macrófagos y promover la recuperación (Figura 4) (29, 30, 33).



quimioquinas locales. Las células B se activan para producir anticuerpos. La quimiotaxis, la adhesión y la migración están asociadas con el movimiento de células linfoides activadas a través de una barrera hematoencefálica debilitada. Diversas señales anti-inflamatorias y proinflamatorias compiten por mantener la salud del SNC, pero una inflamación desregulada conduce a la activación de macrófagos, desmielinización, degeneración axonal y apoptosis. APC = célula presentadora de antígenos; CAMs = moléculas de adhesión celular; CD5 = marcadores y ligandos de superficie celular; IL = interleucina; MMPs = metaloproteinasas de matriz; MU = macrófago; NO = óxido nítrico; TGF β = factor de crecimiento transformante β ; Th = células T auxiliares; TNF- α = factor de necrosis tumoral α . Adaptado de Bernd C. Kieseier (33).

Una mejor comprensión de la cascada inflamatoria asociada con la EM ha llevado al desarrollo de estrategias de intervención novedosas que reducen la formación temprana de lesiones en el SNC. Entre las más importantes de estas intervenciones se encuentra el uso de medicamentos modificadores de la enfermedad para modular la respuesta inmunitaria.

3.2.2 Mecanismo de acción del IFN- β en EM

El mecanismo de acción del IFN- β es complejo, pero parece oponerse en gran medida a los procesos patogénicos resumidos en la sección anterior. Aumenta la producción de agentes anti-inflamatorios como la IL-10, inhibe la IL-17 proinflamatoria, limita la actividad inmunopatogénica de la EM al restringir la migración de leucocitos a través de la barrera hematoencefálica y estimula la producción de factores tróficos como el factor de crecimiento nervioso (FCN), que median la reparación del tejido.

- » Aumenta la producción de citoquinas anti-inflamatorias: Una gran cantidad de datos indican que el IFN- β puede aumentar los niveles de mediadores anti-inflamatorios en el SNC, como la IL-10. En un estudio *ex vivo*, se expusieron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) derivadas de pacientes con EM a la proteína básica de la mielina y se analizaron los perfiles de citoquinas en presencia o ausencia de IFN- β -1a (exposición de 48 horas). La producción de citoquinas Th2, IL-10 e IL-4, se vio significativamente aumentada en los cultivos tratados con IFN- β -1a, mientras que la producción de la citoquina proinflamatoria Th1, TNF- α , no se vio afectada (34). Liu y colaboradores, estudiaron CMSP de pacientes con EM antes y después del tratamiento con IFN- β -1a. No se observaron cambios significativos en la expresión de IL-10 durante los 2 días previos al tratamiento con IFN- β -1a, mientras que la expresión de IL-10 aumentó significativamente en células T CD4⁺ y monocitos durante los 2 días posteriores al tratamiento con IFN- β -1a (35). En general, estos estudios sugieren que el IFN- β puede oponerse al daño en el SNC en parte al aumentar la producción de agentes anti-

- inflamatorios, ayudando así a estabilizar los procesos inflamatorios desregulados en el SNC.
- » Disminuye la producción de citoquinas proinflamatorias: Evidencias *in vitro* e *in vivo* sugieren que el IFN- β -1a también puede disminuir la producción de citoquinas proinflamatorias claves, como IL-17 y osteopontina. En un estudio, la administración *in vitro* de IFN- β -1a inhibió significativamente la producción de osteopontina e IL-17 en células T CD4⁺ (36). En ratones inducidos con EAE tratados con IFN- β -1a, la infiltración en la médula espinal de células osteopontina⁺ e IL-17⁺ disminuyó, al igual que los niveles séricos de osteopontina. Esta reducción en la producción de osteopontina también se asoció con una disminución en la actividad migratoria de las células T (37). Estos cambios pueden estar asociados con (i) la inhibición de la isoforma translacional intracelular de osteopontina, (ii) la acción directa de IFN- β -1a sobre las células T CD4⁺ para regular la expresión de osteopontina e IL-17 a través de la activación, mediada por el receptor de IFN tipo I, de la señal transcripcional de STAT1 y la supresión de la actividad de STAT3, y (iii) la capacidad del IFN- β -1a para inhibir la secreción de IL-17 en las células T a través de la señalización del receptor de IFN- α/β en células dendríticas/mieloides (36, 37). Con respecto a otras citoquinas proinflamatorias, otro estudio demostró que la administración de IFN- β -1a redujo significativamente los niveles de IFN- γ y TNF- α en pacientes con EM (38).
 - » Limita la migración de leucocitos a través de la barrera hematoencefálica: Estudios *in vitro* han demostrado que, al afectar diversas moléculas de adhesión, el IFN- β disminuye la capacidad de las células T para interactuar con las células endoteliales, limitando así la activación autoinmune. En pacientes con EM, se ha demostrado que el IFN- β -1a disminuye los niveles séricos de moléculas de adhesión, como la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), y de citoquinas como el TNF- α (39). En segundo lugar, el tratamiento con IFN- β reduce la actividad de la metaloproteinasa de matriz-9 (MMP-9), enzima que juega un papel crucial en la remodelación de la matriz extracelular y en la migración celular. Finalmente, se ha demostrado que el tratamiento a largo plazo con IFN- β -1a aumenta significativamente los niveles de TIMP-1, inhibidor natural de las metaloproteinasas de matriz como la MMP-9, en el líquido cefalorraquídeo después de 6 meses. Las proporciones más bajas de MMP-9/TIMP-1 tras el tratamiento con IFN- β también se han asociado con una reducción en el número de nuevas y/o activas lesiones en la resonancia magnética (40).
 - » Podría ayudar en la reparación y recuperación del SNC: Estudios *in vitro* y en modelos animales sugieren que el IFN- β puede ayudar en la reparación y recuperación del SNC al

promover la expresión del factor de crecimiento nervioso. Se ha demostrado que el IFN- β aumenta la supervivencia neuronal *in vitro* y eleva la producción del FCN en pacientes con EM (41). En un estudio con cultivos de astrocitos murinos tratados con rhIFN- β , Boutros y colaboradores (42) registraron un aumento de 3 veces en el ARNm del FCN a concentraciones de rhIFN- β de 300 U/ml, y un aumento de 40 veces en el ARNm de FCN a concentraciones de rhIFN- β de 1000 U/ml. Estos aumentos en el ARNm fueron acompañados por incrementos en la proteína FCN en los cultivos de astrocitos. Aunque concentraciones de rhIFN- β de 1000 U/ml no serían factibles en humanos, estos resultados sugieren que el IFN- β podría ser capaz de promover aumentos dependientes de la dosis en la expresión del FCN. Más aún, en un estudio con células endoteliales cerebrales humanas, la producción del FCN se elevó significativamente en los linfocitos T derivados de pacientes tratados con IFN- β en comparación con la de los pacientes no tratados (43).

3.2.3 Inmunogenicidad y efectos adversos asociados a la terapia con rhIFN- β

Una de las principales desventajas del empleo del rhIFN- β como agente terapéutico es que, en algunos pacientes, su administración prolongada puede resultar en un quiebre de la tolerancia inmunológica a antígenos propios, dando como resultado la producción de anticuerpos anti-IFN o también conocidos como ADAs (*Anti-Drug Antibodies*).

En general, tres factores juegan un papel fundamental en la inmunogenicidad de los distintos productos basados en IFN- β : el paciente (estado inmunológico, características genéticas, edad), el tratamiento (dosis, frecuencia, ruta de administración y duración del tratamiento), y los atributos de calidad del producto, tales como la formulación, las propiedades estructurales (secuencia primaria, glicosilación y pegilación), la degradación física (agregación, desnaturalización y mal plegamiento) y la degradación química (oxidación y desamidación).

La alteración estructural más significativa conocida por aumentar la inmunogenicidad del rhIFN- β es la agregación. Incluso pequeñas cantidades de agregados del bioterapéutico pueden provocar una respuesta inmune. La agregación puede introducir nuevos epitopes o arreglar epitopes nativos en una forma repetitiva, lo que conduce a la ruptura de la tolerancia inmune (44).

Los productos farmacéuticos de IFN- β comercializados, como Betaseron/Betaferon (Schering y Berlex Laboratories), Extavia (Novartis), Avonex (Biogen), Rebif (EMD Serono) y

Plegridy (Biogen), tienen diferentes porcentajes de inmunogenicidad en pacientes, siendo los productos de IFN- β -1a (Avonex, Rebif y Plegridy) significativamente menos inmunogénicos que los productos de IFN- β -1b (Betaseron/Betaferon y Extavia). Estos productos difieren en la formulación, dosis, frecuencia y ruta de administración. Estas diferencias y, particularmente, el mayor contenido de agregados en IFN- β -1b, explican la mayor inmunogenicidad de este producto con respecto a su contrapartida producida en células CHO-K1. La evidencia que respalda esta conclusión es que Avonex, con un contenido más bajo de agregados, es menos inmunogénico en pacientes que Betaferon, un producto no glicosilado, con baja solubilidad, baja actividad biológica y un alto grado de agregación (45).

Se ha demostrado que el rhIFN- β con un mayor contenido de agregados tiene más probabilidades de inducir una respuesta inmune y producción de ADAs. En particular, los anticuerpos generados contra rhIFN- β se clasifican en dos grupos: anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes. Como se mencionó anteriormente, el rhIFN- β induce sus acciones biológicas al unirse al complejo receptor IFNAR-1 en la superficie de las células, lo que conduce a la activación de las vías de señalización. Los ADAs no neutralizantes se unen al rhIFN- β , pero no necesariamente inhiben la unión al complejo receptor y pueden tener efectos en la farmacocinética. Mientras que, los anticuerpos neutralizantes sí impiden la unión del rhIFN- β a su receptor y pueden ocasionar efectos graves, tales como una reducción de la eficacia del fármaco y/o la aceleración de la progresión de la enfermedad. En una primera instancia ocurre la producción de anticuerpos no neutralizantes, los cuales pueden detectarse dentro de los primeros meses de tratamiento. Sin embargo, su tasa de aparición depende del producto utilizado. Por ejemplo, en el caso de la terapia con rhIFN- β -1b, la mayoría de los pacientes los desarrollan dentro de los 3 meses posteriores al inicio del tratamiento. En contraste, solo el 10% de los pacientes tratados con IFN- β -1a desarrollaron anticuerpos en el mismo período. Sin embargo, luego, entre los 6 y los 18 meses de haber iniciado el tratamiento, se pueden detectar anticuerpos neutralizantes en el 25% de los pacientes (46). Varios estudios han demostrado que estos anticuerpos constituyen un factor importante en el fracaso del tratamiento. En general, la reducción en la tasa de recaída en individuos que no han desarrollado anticuerpos neutralizantes puede llegar al 50%. Por el contrario, los pacientes que desarrollan anticuerpos anti-droga tienen mayores tasas de recaída y mayores tasas de progresión de la enfermedad (20). En otro estudio realizado por Cohen y colaboradores (47) en una cohorte de 846 pacientes con EMRR tratados con rhIFN- β se demostró que el 88% de los pacientes que recibieron rhIFN- β -1b, el 45% de los tratados con rhIFN- β -1a por administración intramuscular y el 56% de pacientes tratados con rhIFN- β -1a por inyección subcutánea desarrollaron anticuerpos contra la droga en algún momento del tratamiento, durante 1 a 4 años. Además, se detectaron

anticuerpos neutralizantes en el 37%, 12% y 51 % de estos pacientes, respectivamente. En algunos casos, estos anticuerpos provocan efectos secundarios graves.

La formación de nuevos epitopes en el rhIFN- β , por diversas causas, es uno de los factores más importante en la producción de anticuerpos anti-droga. El IFN- β contiene dos tipos de epitopes diferentes, aquellos reconocidos por las células T y los epitopes que unen el receptor de las células B. Consecuentemente, la modificación de los epitopes dominantes y subdominantes reconocidos por las células T y B puede reducir la inmunogenicidad. Sin embargo, la respuesta inmune contra el rhIFN- β puede disminuir si los epitopes dominantes y subdominantes se modifican cuidadosamente (48).

4. MECANISMOS ASOCIADOS A LA INMUNOGENIDAD DE PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS

El número de proteínas terapéuticas disponibles para uso en ensayos clínicos ha aumentado de manera significativa en los últimos años. Esta categoría de bioterapéuticos incluye citoquinas humanas recombinantes (por ejemplo, IFN- α e IFN- β), factores de crecimiento celular (como el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF)), hormonas (por ejemplo, glucagón), antagonistas neuromusculares (como la toxina botulínica), productos sanguíneos (por ejemplo, factor de coagulación VIII) y anticuerpos monoclonales. Aunque las proteínas terapéuticas se consideran generalmente seguras y no tóxicas, pueden desarrollarse anticuerpos contra las mismas durante el tratamiento. Estos anticuerpos (ADAs) podrían neutralizar, o bien, comprometer el efecto clínico de los tratamientos y también pueden estar asociados con eventos adversos graves relacionados con la reactividad cruzada con proteínas autólogas (49).

La generación de ADAs no es particularmente sorprendente en estos casos, ya que podría considerarse una reacción similar a la desarrollada por el sistema inmune contra una vacuna basada en proteínas. Por lo tanto, los ADAs también pueden desarrollarse contra proteínas autólogas recombinantes, como la eritropoyetina (50), el rhIFN- α (51) y el rhIFN- β (20, 46, 47) entre otros.

4.1 Generación de ADAs

La mayoría de los efectos adversos de una respuesta inmune contra una proteína terapéutica están fundamentalmente mediados por mecanismos humorales, por lo que la presencia de anticuerpos circulantes contra la proteína terapéutica ha sido el criterio para

definir la existencia de una respuesta inmune hacia este tipo de productos. En este sentido, dado que la tolerancia es considerada como el estado normal de la respuesta inmune frente a proteínas autólogas, el desarrollo de ADAs hacia una proteína autóloga recombinante se puede considerar como un quiebre en la tolerancia inmunológica (49).

En general, las células T y B cuyos receptores reconocen antígenos propios, son eliminadas durante la maduración del sistema inmune en el timo (para las células T) y en la médula ósea (para células B). Sin embargo, existe evidencia de la presencia de células T autorreactivas en circulación en sangre periférica que han escapado a los mecanismos de selección en el timo. De hecho, entre el 25 y el 40% de las células T autorreactivas escapan hacia la periferia por poseer baja avidéz (52, 53) o por ausencia de expresión o procesamiento de los epitopes T en el timo (54). Teniendo en cuenta esto, no resulta sorprendente que en algunos pacientes tratados con IFN- β se produzca una respuesta inmune anti-droga mediada por células T.

En el contexto de una respuesta mediada por células B, el desarrollo de anticuerpos puede ser independiente de linfocitos T (Ti) o dependiente de linfocitos T (Td). La activación de células B en una respuesta de tipo Ti tiene lugar cuando ciertos motivos estructurales de algunas moléculas, tales como repeticiones poliméricas, inducen la generación de las señales requeridas para estimular la activación de un grupo de células B. Este tipo de respuesta generalmente no conduce a la maduración de la afinidad de los anticuerpos producidos ni al desarrollo de células de memoria. Por el contrario, la activación Td de linfocitos B está relacionada fundamentalmente con la secuencia de la proteína y la respuesta humoral generada suele ser mucho más robusta, con maduración de la afinidad y cambio de isotipo de los anticuerpos producidos y desarrollo de células B de memoria. Por este motivo, el análisis de la activación de linfocitos T permitiría predecir la generación de una respuesta humoral contra la proteína terapéutica (49, 55).

4.2 Vía de activación de linfocitos B dependiente de linfocitos T y generación de ADAs

Los linfocitos T son células especializadas del sistema inmune capaces de mediar funciones tanto efectoras, destinadas fundamentalmente a remover infecciones, como supresoras, capaces de promover la tolerancia inmunológica. Los linfocitos T se originan en la médula ósea pero su maduración tiene lugar en el timo. Una vez que son exportados hacia la periferia constituyen una amplia diversidad de subpoblaciones de linfocitos T, que se pueden agrupar en cuatro grandes categorías según la función que desempeñan: citotóxicos (o linfocitos

T CD8⁺), colaboradores (o linfocitos T CD4⁺), regulatorios y de memoria. En todos los casos, los linfocitos T reconocen los antígenos presentados en la superficie de otras células, utilizando un receptor específico denominado TCR (*T-cell receptor*) y ejercen su acción por medio de la liberación de diferentes conjuntos de citoquinas.

Las células T CD4⁺ cumplen un rol esencial en el desarrollo de ADAs contra las proteínas terapéuticas ya que están implicadas en la activación de linfocitos B Td que dará luego lugar a la producción de anticuerpos.

4.2.1 Internalización de las proteínas extracelulares por las CPAs y presentación antigénica a los linfocitos T CD4⁺

La respuesta inmune desarrollada contra una proteína terapéutica comienza con el reconocimiento de la molécula y su posterior internalización por parte de las células presentadoras de antígeno profesionales. Estas CPAs son poblaciones celulares especializadas, principalmente células dendríticas, linfocitos B y macrófagos, que tienen la capacidad de capturar antígenos, procesarlos y presentarlos en su superficie a los linfocitos T y proveer señales que estimulen la proliferación y diferenciación de los mismos (13).

La CPA más efectiva es la célula dendrítica, dado que presenta la mayor capacidad de estimulación y activación de linfocitos T CD4⁺ vírgenes. Se estima que una célula dendrítica puede activar entre 100 y 3000 linfocitos T (56). Las células dendríticas comprenden una población celular heterogénea derivada de diferentes linajes hematopoyéticos y se caracterizan por poseer patrones específicos de localización con funciones inmunológicas especializadas, tanto en el desarrollo de la respuesta inmune como así también en la inducción de tolerancia (57). La abundancia de células dendríticas en circulación es relativamente baja, sin embargo, se encuentran ubicuamente distribuidas en los diferentes tejidos del organismo, funcionando como sensores muy eficientes del material extraño y potencialmente peligroso (58).

De acuerdo a sus características fenotípicas y funcionales, las células dendríticas pueden dividirse en dos grandes grupos: convencionales (CDc) y plasmocitoides (CDp). Ambas poblaciones celulares se diferencian en sus marcadores de superficie a nivel fenotípico, y funcionalmente, presentan notables diferencias: mientras que, la función central de las CDp consiste en mediar una poderosa respuesta antiviral a través de la secreción de grandes cantidades de IFNs de tipo I en la fase aguda de la infección, las CDc tienen como función principal activar a los linfocitos T vírgenes y orientar el curso de la inmunidad adaptativa. Luego del reconocimiento antigénico y complejas señales extracelulares que permiten su activación,

las CDc que se encuentran presentes en los diversos tejidos (piel, mucosas, parénquima de los órganos, en otros) migran hacia los órganos linfáticos, donde llevarán a cabo la presentación del antígeno capturado a los linfocitos T vírgenes (13).

Cuando una proteína terapéutica ingresa al organismo, las CDc que residen en el tejido donde se deposita el producto, internalizan la proteína, la procesan y presentan los péptidos derivados a los linfocitos T CD4⁺. Por este motivo, en el presente trabajo el término célula dendrítica se empleará exclusivamente para hacer referencia a la subpoblación de CDc. Una característica importante entre las propiedades funcionales de esta población es su maduración, un proceso de diferenciación a través del cual las células especializadas en la captura de antígenos se transforman en células especializadas en la estimulación de linfocitos T (59).

Cuando son aún inmaduras, las células dendríticas se caracterizan por poseer gran capacidad endocítica y de procesamiento antigénico y bajo potencial de activación de linfocitos T. En este estadio estas células no expresan cantidades significativas de moléculas coestimuladoras como CD80 (B7.1), CD86 (B7.2) y CD54 (ICAM-1), entre otras moléculas esenciales para la estimulación de células T (56). La función principal de las células dendríticas inmaduras consiste en monitorear constantemente el medio que las rodea en busca de antígenos. Para alcanzar el estado de maduración es necesario que identifiquen una señal “no propia”, a través del reconocimiento de diferentes patrones moleculares por medio de diversos tipos de receptores. Estos receptores incluyen miembros de la familia de las lectinas de tipo C (DEC-205, DCIR, Dectin-2 y CLEC-1), miembros de la familia de las inmunoglobulinas (DORA e ILT3), receptores de proteínas de choque térmico, receptores de tipo toll (TLR) como TLR-3 y TLR-4 y receptores del fragmento constante (Fc) de las inmunoglobulinas como FcγR y FcεR, entre otros. Al entrar en contacto con el antígeno, internalizarlo y procesarlo, la célula dendrítica comienza su proceso de maduración, guiado además por citoquinas del medio extracelular (como TNF-α o IFN-γ) y por interacciones establecidas con otras células del sistema inmune (13).

Durante su maduración, las células dendríticas experimentan un conjunto de cambios que les permitirán, en última instancia, activar a los linfocitos T vírgenes. Comienzan a disminuir notablemente su capacidad de endocitosis y procesamiento antigénico, lo que limita el repertorio de antígenos presentados por estas células a aquellos capturados en el foco infeccioso. Al mismo tiempo se incrementa la expresión de la molécula CCR7, receptor de las quimiocinas CCL19 y CCL21, las cuales son producidas constitutivamente en los ganglios linfáticos y que se encuentran también en los vasos linfáticos. De esta manera, la expresión de CCR7 permite la migración de las células dendríticas maduras, a través de los vasos linfáticos aferentes, hacia los órganos linfáticos drenantes del sitio de infección. La maduración de las células dendríticas se asocia también con una disminución de la expresión de moléculas tales

como la E-cadherina (molécula encargada de establecer uniones entre las células dendríticas y las células epiteliales de los diferentes tejidos) favoreciendo la migración hacia los ganglios linfáticos. Además, se incrementa notablemente la expresión de las moléculas asociadas con el proceso de presentación antigénica: moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (CMH-I) y clase II (CMH-II) y moléculas coestimuladoras (CD80, CD86, CD54). Por último, durante el proceso de maduración se estimula también la producción de un conjunto de citoquinas, cuyo patrón particular dependerá del tipo de respuesta inmune que se esté desarrollando (12, 13).

El proceso de presentación de antígenos extracelulares (esto incluye a las proteínas terapéuticas) a los linfocitos T $CD4^+$ vírgenes se inicia con la captura del antígeno por parte de las células dendríticas inmaduras. En la Figura 5 se muestra un esquema del mecanismo de presentación antigénica que se describe a continuación.

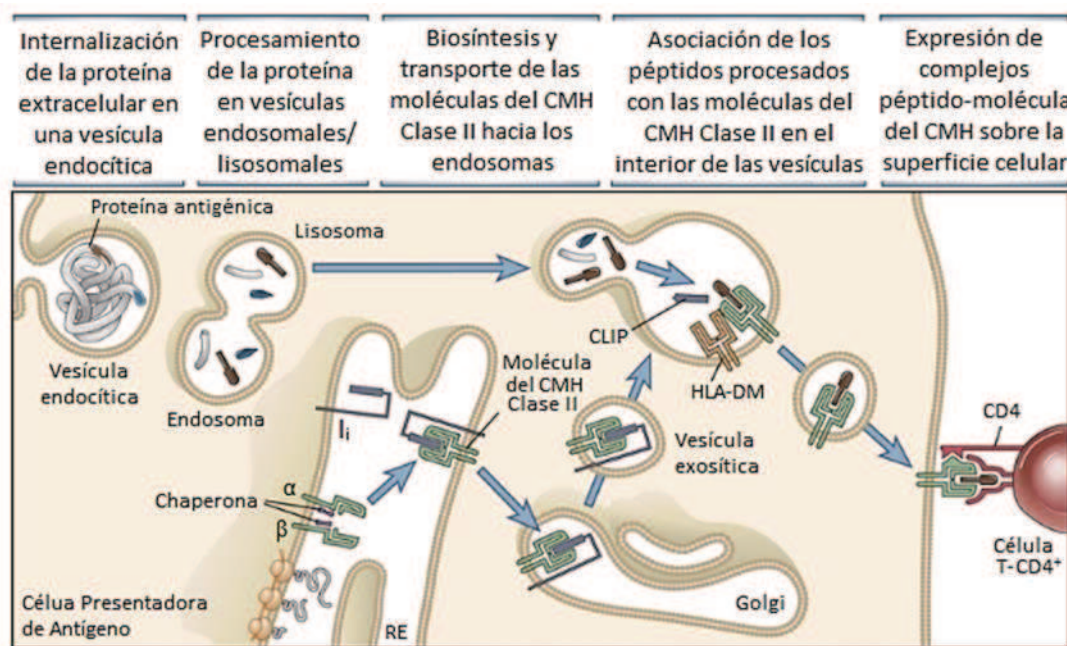


Fig. 5. Presentación antigénica a través de las moléculas del CMH-II. Los pasos involucrados en el procesamiento de antígenos extracelulares se describen en el texto. CLIP: péptido de la cadena invariante asociada a moléculas del CMH-II; RE: retículo endoplasmático; Ii: cadena invariante. Adaptado de Abbas y col. (13).

Inicialmente, la proteína es internalizada en vesículas endocíticas que se fusionan luego con los lisosomas, los cuales contienen proteasas capaces de degradar la molécula en pequeños fragmentos peptídicos. Al mismo tiempo, las moléculas del CMH-II son sintetizadas en el retículo endoplasmático (RE) asociadas a una cadena, la cadena invariante (Ii). Esta Ii ocupa una hendidura (también llamada "bolsillo") en la molécula del CMH-II recientemente sintetizada, en

la que se producirá luego la unión peptídica. Esta *Ii* promueve el plegado y ensamblado de las moléculas del CMH-II y direcciona el transporte de las mismas en vesículas exocíticas hacia los endosomas, que contienen los antígenos internalizados y procesados. Una vez que se encuentran en el interior de estas vesículas endosomales, la *Ii* se disocia de la molécula del CMH-II, por medio de la acción de enzimas proteolíticas que dejan un péptido de 24 aminoácidos de longitud, llamado CLIP (del inglés *Class II-associated Invariant Chain Peptide*), ocupando el surco de unión al antígeno de las moléculas del CMH-II. Posteriormente, el péptido CLIP es removido por medio de la acción de una molécula llamada HLA-DM, la cual presenta una estructura similar a las moléculas del CMH-II y que co-localiza con éstas en el compartimiento endosómico. Esta molécula actúa como un intercambiador peptídico, facilitando la remoción del péptido CLIP de la hendidura de las CMH-II y la posterior unión de los péptidos antigénicos circundantes. De esta manera, se generan diversos complejos péptido-CMH-II, los cuales serán luego transportados a la superficie celular para ser presentados a las células T CD4⁺ (13).

4.2.2 Activación de los linfocitos T CD4⁺

Los linfocitos T CD4⁺ intervienen en una variedad de eventos en el sistema inmune adaptativo tanto celular como humoral: colaboran en las respuestas de los linfocitos T CD8⁺ vírgenes (naïve) y de los linfocitos B, generan respuestas secundarias y contribuyen a la inducción y sostenibilidad de la memoria inmunitaria (60).

El proceso de activación y diferenciación de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes consta de tres señales imprescindibles: el reconocimiento del antígeno, las señales de coestimulación y la secreción de citoquinas por parte de las CPAs que polarizarán la diferenciación del linfocito hacia un perfil determinado. La señal inicial de activación de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes está dada por la interacción con las CPAs, mediante la cual los linfocitos T CD4⁺ son capaces de reconocer específicamente los péptidos derivados del procesamiento antigénico, expuestos en la superficie de las CPAs en el contexto de las moléculas del CMH-II, a través del TCR. El TCR está formado por dos cadenas distintas, que conforman un heterodímero anclado a la membrana celular. Por su estructura, estas cadenas pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, y al igual que éstas, presentan un dominio de elevada variabilidad en la zona aminoterminal y un dominio constante en la región carboxiterminal. Esta gran variabilidad del TCR, concentrada básicamente en la región que permite el reconocimiento antigénico, da lugar a la existencia de un amplio repertorio de receptores, integrado por millones de especificidades diferentes. Cada linfocito expresa un único tipo de TCR, con especificidad singular, constituyendo así una gran población celular compuesta por centenares de millones de clones diferentes (12).

El reconocimiento de un determinado complejo péptido-molécula del CMH-II por parte un linfocito T $CD4^+$ virgen pone en marcha una serie de vías transduccionales que provocan un incremento en la afinidad de una integrina expresada en la superficie de la célula T, la molécula LFA-1 (*Lymphocyte Function-associated Antigen 1*), hacia las moléculas ICAM-1 e ICAM-2 (ICAM, *Intercellular Adhesion Molecule*), presentes en la superficie de la célula dendrítica madura. Esta interacción estabiliza la unión entre ambas células, a fin de que el linfocito T pueda reconocer adecuadamente el péptido antigénico presentado. Además, la molécula correceptora $CD4$, presente en la superficie de la célula T, facilita este reconocimiento al interactuar con ciertos residuos conservados de la molécula del CMH-II, lo que estabiliza la interacción del TCR con el complejo CMH-II-péptido (Figura 6) (12).

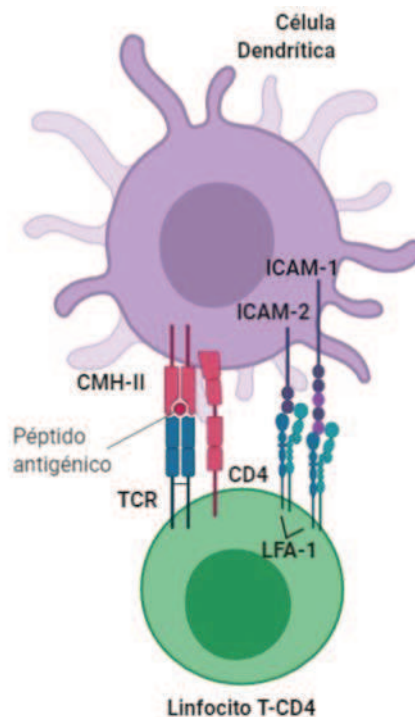


Fig. 6. El reconocimiento antigénico estabiliza la unión entre la CD y el linfocito T $CD4^+$. El reconocimiento del péptido antigénico, presentado por moléculas del CMH-II a través del TCR induce un cambio conformacional en integrina LFA-1 expresada en la célula T que produce un incremento en su afinidad por las moléculas ICAM-1 e ICAM-2 expresadas por la CD, estabilizando la unión entre ambas células. La interacción de $CD4$ con la molécula del CMH-II facilita el reconocimiento antigénico al estabilizar la unión del TCR con el complejo péptido-molécula del CMH. Adaptado de Fainboim y Geffner (12).

La interacción del TCR del linfocito T $CD4^+$ virgen con un epítopo antigénico constituye la primera señal necesaria para la activación del linfocito. Para completar dicho proceso es requerida una segunda señal, la cual es inducida por la interacción establecida entre las moléculas $CD80$ y $CD86$, expresadas por las células dendríticas maduras, y la molécula $CD28$,

expresada en forma constitutiva por las células T vírgenes. El entrecruzamiento de CD28, inducido por la interacción con CD80 y CD86, provee la señal 2 de activación del linfocito T, permitiéndole expresar un receptor de IL-2 de alta afinidad y comenzar la producción de la propia IL-2, que actuará estimulando la expansión clonal T de manera autócrina y parácrina. Aquellos linfocitos T vírgenes que no perciban esta última señal sufrirán un proceso de anergia irreversible, que conducirá a su muerte. Es decir que solo si la célula dendrítica expresa suficiente cantidad de moléculas coestimuladoras, el reconocimiento antigénico se traducirá en activación y expansión clonal del linfocito T, capaz de interactuar con los linfocitos B y mediar su activación y consecuente producción de anticuerpos (49, 60). En la Figura 7 se ilustra la interacción entre una célula T CD4⁺ virgen y una célula dendrítica madura.

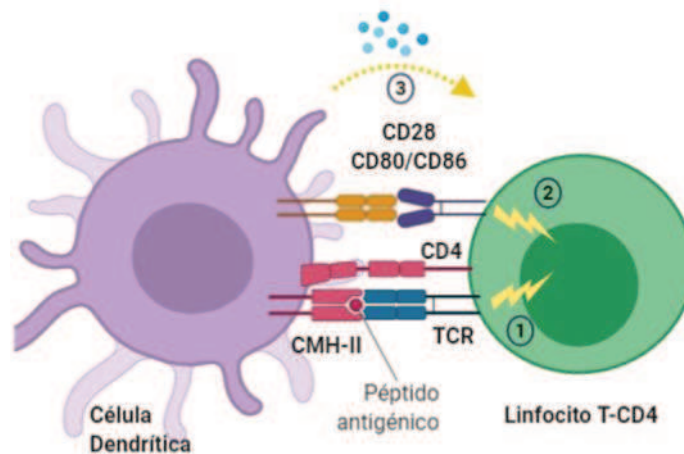


Fig. 7. La activación y diferenciación del linfocito T requiere tres señales: La primera señal (1) es inducida por el reconocimiento del péptido antigénico por parte del TCR. La segunda señal (coestimulación) (2) es inducida por la interacción entre CD80/CD86 expresada en la CD y CD28 presente en el linfocito T. Finalmente, la tercera señal (3) está dada por el conjunto de citoquinas secretadas por la célula dendrítica activada que polarizan la diferenciación del linfocito T hacia un perfil determinado. Adaptada de Fainboim y Geffner (12).

Los linfocitos T CD4⁺ activados pueden diferenciarse en muy diversos perfiles de respuesta, especializándose en la producción de un conjunto de citoquinas particulares según el perfil que hayan adoptado. Estas citoquinas guiarán la progresión de la respuesta inmune en diferentes sentidos, según el tipo de respuesta que se esté desarrollando.

4.2.3 Activación T-dependiente de linfocitos B

Durante su desarrollo en la médula ósea, los linfocitos B adquieren el receptor antigénico denominado BCR (*B-cell receptor*), el cual está constituido por una inmunoglobulina

(Ig) de superficie (IgM/IgD) asociada con un heterodímero (Ig α -Ig β). Cuando la inmunoglobulina de superficie reconoce específicamente los epitopes antigénicos de la proteína en su conformación nativa, se induce el entrecruzamiento del receptor. La agregación del BCR en la superficie del linfocito B constituye la primera señal necesaria para su activación y promueve la internalización de la proteína completa, que será luego procesada en pequeños péptidos antigénicos. Posteriormente, los epitopes peptídicos resultantes del procesamiento de la proteína se asocian con las moléculas del CMH-II, tal como sucede en la presentación antigénica mediada por células dendríticas, y se trasladan a la membrana celular (49).

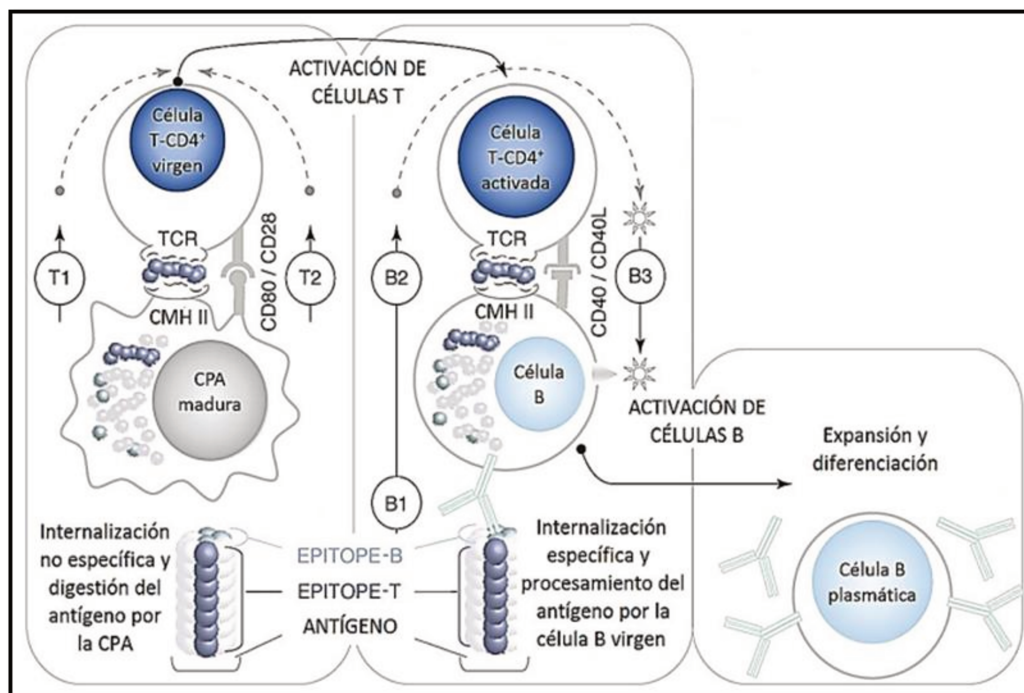


Fig. 8. Esquema de activación de linfocitos B dependientes de linfocitos T. En primer lugar, las CPAs profesionales producen la internalización no-específica de antígenos proteicos para degradarlos en pequeños péptidos que serán presentados a los linfocitos T vírgenes en el contexto del CMH-II. La interacción entre dicho complejo y el TCR dan lugar a la señal 1 de activación de linfocitos T (T1). Las señales provenientes de las moléculas co-estimuladoras constituyen la señal 2 (T2). Para la activación de los linfocitos B, se requiere el reconocimiento del antígeno en su conformación nativa a través de los receptores IgM/IgD de superficie (señal B1). Este linfocito B internaliza el antígeno, lo procesa en pequeños péptidos, que luego son presentados en el contexto del CMH-II a los linfocitos T previamente activados. Mediante el TCR, los linfocitos T reconocen dicho complejo y secretan citoquinas que favorecen la activación de los linfocitos B (señal B2). Se produce un aumento de la expresión de CD40 en el linfocito B que interacciona con el CD40L del linfocito T (señal que se indica como B3). Este conjunto de eventos conduce a la activación, proliferación y diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas productoras de anticuerpos y a linfocitos B de memoria. Adaptado de De Groot y Scott (49).

Para que se complete la activación de los linfocitos B (además del reconocimiento específico del antígeno, su procesamiento y presentación en la superficie) es necesaria una

segunda señal, la cual está dada, en primer lugar, por la interacción del TCR de la célula T CD4⁺ activada, con los complejos péptido-molécula del CMH-II presentes en la superficie del linfocito B. Esta unión estimula la expresión de la molécula CD40 en la superficie de la célula B y la secreción de diversas citoquinas por parte de la célula T. Adicionalmente, se requiere un segundo punto de contacto entre los linfocitos B y los linfocitos T, que ocurre a través de la molécula CD40 y su ligando, CD154 (CD40L), presente en la superficie de los linfocitos T.

De esta manera, cuando ambas interacciones han tenido lugar, se completa la segunda señal de activación de las células B, que dará lugar a la producción de anticuerpos. Sin la participación de los linfocitos T, que proveen la segunda señal, los linfocitos B sufren una muerte celular programada o apoptosis.

En la Figura 8 se muestra un resumen del proceso de activación de linfocitos B dependiente de linfocitos T.

5. MÉTODOS PARA DETERMINAR LA INMUNOGENICIDAD DE PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS

El análisis de la inmunogenicidad de las proteínas de uso terapéutico humano ocupa un lugar preponderante en el proceso productivo de las mismas, debido al impacto directo de esta característica sobre la eficacia y seguridad de la terapia. Los anticuerpos anti-droga pueden neutralizar la función terapéutica, influir en la farmacocinética y, en algunos casos, provocar efectos adversos severos. Por este motivo, las agencias regulatorias de los EE.UU., FDA, y de Europa, EMA, han desarrollado minuciosas guías en las que se describen los principales aspectos a tener en cuenta al momento de informar la inmunogenicidad potencial del producto. En efecto, actualmente estos ensayos constituyen uno de los requisitos necesarios para realizar el registro inicial de nuevos candidatos terapéuticos (61, 62).

Como se mencionó anteriormente, una de las principales causas de la generación de ADAs es el reconocimiento de regiones antigénicas presentes en la proteína terapéutica. Algunos antígenos pueden activar las células B sin la ayuda de las células T. Sin embargo, las respuestas de anticuerpos robustas y sostenidas contra la mayoría de los antígenos dependen de que las células T y B reconozcan el antígeno en forma conjunta. Por este motivo, el análisis de la activación y proliferación de las células T en presencia de la proteína terapéutica se ha utilizado para el desarrollo de ensayos que permitan predecir la inmunogenicidad de la misma (63).

La evaluación de la inmunogenicidad de un bioterapéutico es una tarea compleja que involucra el empleo de diversas estrategias complementarias como son: predicción de la

inmunogenicidad *in silico* empleando herramientas bioinformáticas; modelos *in vivo* para ensayos preclínicos (estudios en ratones transgénicos) y clínicos; y, plataformas experimentales *in vitro*. Para el caso de los modelos *in vivo*, éstos pueden presentar dificultad para la predicción de la incidencia de la inmunogenicidad debido a las diferencias entre el sistema inmune humano y el del animal de experimentación; este problema puede resolverse, por ejemplo, mediante el empleo de ratones transgénicos cuyo sistema de presentación antigénica endógeno (H2 de Clase I y II) se ha eliminado y ha sido reemplazado por los alelos que codifican para proteínas del CMH humano. Por otro lado, los modelos *in vitro* son útiles para predecir si la proteína interactuará con las moléculas del CMH; sin embargo, estos sistemas no exponen la proteína a todos los factores que pueden influir en la inmunogenicidad en pacientes. En cuanto a los modelos *in silico*, éstos pueden ser útiles para predecir epitopes potencialmente inmunogénicos, pero siempre requieren de una validación basada en pruebas *in vitro* e *in vivo* (64).

Por este motivo, el análisis de la inmunogenicidad de proteínas terapéuticas contempla una variedad de estudios *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. La aplicación conjunta de los mismos ha demostrado una gran utilidad en numerosos casos.

5.1 Métodos de predicción de la inmunogenicidad *in silico* mediante algoritmos computacionales

A partir de los avances en el campo de la bioinformática, en la actualidad existen métodos que, a través del uso de estrategias de modelado molecular y algoritmos matemáticos, permiten predecir la inmunogenicidad potencial de una proteína. Estos métodos usualmente realizan un análisis de la secuencia aminoacídica de las proteínas terapéuticas y evalúan posteriormente, la probabilidad de unión de péptidos derivados de la misma con distintas moléculas de CMH-II, conocidas en humanos como HLA (del inglés *Human Leukocyte Antigen*). La afinidad de unión de los péptidos derivados de las proteínas terapéuticas a las diferentes moléculas HLA es una característica particularmente importante en el contexto de la respuesta inmune frente a estos productos. Por este motivo, numerosos algoritmos han sido desarrollados en base a la identificación de aquellos péptidos con elevada probabilidad de unión a las moléculas HLA más predominantes en la población mundial (65, 66). En adición, permiten identificar los aminoácidos con mayor contribución a la antigenicidad del péptido y las mutaciones que generen una reducción de la misma. De esta manera permiten llevar a cabo el desarrollo de proteínas que presenten una inmunogenicidad reducida.

Las moléculas del CMH-II pueden acomodar secuencias de entre diez y treinta aminoácidos en la hendidura del sitio de unión al péptido, con una longitud óptima de doce a dieciséis aminoácidos. La longitud del motivo de unión depende de las propiedades de los aminoácidos que la componen (tamaño, polaridad, carga y posición) y tienen una elevada influencia sobre la probabilidad de unión del péptido a una molécula HLA específica. Además, debido a la forma relativamente abierta que presenta el bolsillo de unión de las moléculas CMH-II, se ha encontrado que las propiedades de las cadenas laterales de ciertos aminoácidos, ubicados en determinadas posiciones del “surco” o “bolsillo” de unión de las moléculas del CMH-II, también ejercen un rol en la precisión de la predicción. Es por esto que usualmente el estudio de esta interacción incluye a aquellos aminoácidos que componen el núcleo o “core” central, así como a los residuos que flanquean el sitio de unión, posicionados por fuera del mismo (67, 68).

Los métodos de predicción *in silico* disponibles permiten modelar las interacciones entre los péptidos y las moléculas del CMH-II, asignándole un valor o “score de antigenicidad” a cada péptido evaluado según la probabilidad que posee dicha secuencia peptídica de interactuar con una molécula HLA específica (antigenicidad). Además, existen numerosos algoritmos que evalúan el contenido total de epitopes con la capacidad potencial de desencadenar una respuesta inmune T dependiente y posibilitan la predicción de la inmunogenicidad global de una proteína, asignando un “score de inmunogenicidad”. De esta manera se puede comparar la inmunogenicidad potencial de distintas variantes de una proteína. La diferencia principal entre los diversos tipos de algoritmos radica en su capacidad para predecir la inmunogenicidad global y los epitopes dentro de la proteína. En este sentido, si bien la información disponible en las bases de datos de epitopes sirve para predecir y analizar posibles sitios antigénicos y para evaluar el efecto de las mutaciones sobre la inmunogenicidad de los mismos, también es necesaria la validación experimental que confirme los resultados obtenidos a partir de estos algoritmos (69).

Dentro de los diversos algoritmos de uso libre para el mapeo de epitopes peptídicos, se encuentran: MHCPred, IEDB-MHCII, Rankpep, MHC2PRED, EpiTOP, SYFPEITHI, TEPITOPE, ProPred, NetMHCII, y KernelRLSPan, entre otros. Además, existen una serie de algoritmos de predicción de epitopes desarrollados por compañías privadas, como es el caso del conjunto de herramientas ISPRI (del inglés *Interactive Screening and Protein Reengineering Interface*) desarrollado por la empresa EpiVax Inc. El mismo permite establecer predicciones de epitopes T para moléculas del CMH-II con una precisión de un 5 a un 15% mayor que el resto de los algoritmos (65) y es el que se ha empleado en el presente estudio.

5.2 Validación experimental: ensayos *in vitro* y *ex vivo*

Las herramientas de predicción *in silico* de la inmunogenicidad de las proteínas terapéuticas brindan información muy útil sobre su potencial inmunogénico y permiten predecir el efecto que tendrán cambios puntuales sobre el mismo. Sin embargo, estas herramientas suelen sobreestimar la inmunogenicidad de las proteínas terapéuticas. Esto se debe a que estas herramientas de predicción no contemplan la influencia del procesamiento antigénico y del reconocimiento de los complejos péptido-molécula del CMH-II por el TCR en el desarrollo de la respuesta inmune (65). Es por esto que, debido a su rápida y simple ejecución, son empleadas frecuentemente como una primera etapa del estudio. Luego de esto, se requerirán un conjunto de ensayos experimentales que permitan la confirmación de tales predicciones, para poder establecer un ordenamiento de los péptidos inmunogénicos de acuerdo a su capacidad de inducción de una respuesta inmune mediada por células T.

5.2.1 Validación mediante ensayos *in vitro*

Entre los ensayos de validación experimental *in vitro* más empleados se destacan los ensayos que evalúan la interacción de los péptidos sintéticos, que conforman la secuencia primaria de la proteína terapéutica, con los distintos alelos de las moléculas del HLA de clase II. Un set de alelos del HLA frecuentemente analizados son los alelos prototípicos DRB1*0101, DRB1*0301, DRB1*0401, DRB1*0701, DRB1*0801, DRB1*1101, DRB1*1301 y DRB1*1501, que representan más del 90% de la diversidad alélica de la población mundial (70).

Conjuntamente, a partir de los avances significativos en la tecnología de espectrometría de masas, se han identificado los péptidos efectivamente procesados y presentados en la superficie de las CPAs por medio de la aplicación de la tecnología MAPPs (del inglés, *MHC-associated peptide proteomics*). Los resultados de estos ensayos confirman el rol fundamental del procesamiento natural de los antígenos en la identificación de los epitopes potenciales para células T, evidenciado por un menor número de péptidos en los bolsillos de unión de las moléculas del HLA que los predichos por los análisis *in silico* e incluso por los ensayos de unión (71).

5.2.2 Validación mediante ensayos *ex vivo*

Los ensayos *ex vivo*, es decir, empleando células provenientes de sangre periférica humana, se han desarrollado para evaluar la asociación directa entre la presencia de epitopes

para células T en una secuencia proteica y el título y longevidad de ADAs desarrollados. Estos estudios permiten evaluar la internalización de la proteína terapéutica, su procesamiento y presentación de los epitopes peptídicos capaces de inducir proliferación celular, cambios fenotípicos y liberación de citoquinas por parte de las células T.

En el año 2010, Wullner y colaboradores (72) propusieron una estrategia que consiste en la incubación directa de CMSP humana con la proteína de interés o con una mezcla de péptidos derivados de la misma. De esta manera, las CPAs presentes en la muestra endocitan, procesan y presentan los péptidos generados. Luego, los complejos péptido-molécula del CMH-II pueden ser reconocidos por las células T presentes entre las CMSP, dando lugar a su activación y proliferación. Finalmente, se determina la respuesta inducida por la proteína terapéutica a través de la cuantificación de citoquinas características de los perfiles T efectores tales como IFN- γ e IL-4, que caracterizan los perfiles Th1 y Th2, respectivamente.

Una metodología alternativa que permite analizar la respuesta inmune frente a proteínas terapéuticas fue descrita por Jaber y Baker (73), en la cual también se emplean CMSP humana, pero realizando una etapa previa de separación de los monocitos y de las células T presentes en la muestra. Brevemente, el método consiste en aislar los monocitos presentes en la muestra de CMSP de cada donante, diferenciarlos a células dendríticas e incubarlas luego con la proteína a evaluar. De esta manera, se obtienen CDs maduras que presentarán los péptidos antigénicos y serán co-cultivadas posteriormente con los linfocitos T CD4⁺ autólogos (del mismo donante). Si en la muestra existen células T capaces de reconocer específicamente los complejos péptido-molécula del CMH-II presentados por las células dendríticas, tendrá lugar una proliferación linfocitaria y su posterior diferenciación en un perfil efector determinado.

El análisis de la respuesta producida por las células T cultivadas *ex vivo* puede hacerse a través de diferentes ensayos. Los más sencillos consisten en la determinación de la proliferación celular, midiendo la incorporación de timidina marcada, o en la cuantificación de las citoquinas secretadas por parte de las células T antígeno-específicas por medio de técnicas de ELISA o del número de células T activadas, por medio de ensayos de ELISpot. En la actualidad, la citometría de flujo de alta dimensionalidad (74), junto con los ensayos de Marcadores Inducidos por Activación (MIA) (75) han demostrado ser un medio accesible y rápido para la detección de células T específicas de antígenos. En conjunto, estas metodologías brindan información de la inmunogenicidad potencial de una proteína terapéutica. Sin embargo, presentan ciertas limitaciones, propias de las plataformas *in vitro*. Por este motivo, numerosos estudios *in vivo* han sido desarrollados en modelos animales, algunos de los cuales se describen a continuación.

5.3 Métodos *in vivo*

En un principio, para evaluar la seguridad y toxicidad de distintos tipos de fármacos, se empleaban ensayos *in vivo* que se realizaban en modelos animales tradicionales, tales como ratas, ratones o primates no humanos. No obstante, estos modelos presentan una correlación limitada al momento de determinar el potencial inmunogénico de las proteínas terapéuticas en humanos, debido a que el mecanismo inmunológico que se desencadena al administrar el terapéutico corresponde a la clásica respuesta hacia un antígeno extraño, y no al de ruptura de tolerancia. Esto se debe a que la mayoría de estas proteínas son reconocidas como agentes extraños cuando son administradas a otras especies de mamíferos. Como consecuencia de esto, resulta difícil establecer un modelo animal que imite en forma precisa el escenario inmunológico que se generará cuando el terapéutico sea administrado en humanos. Para superar estas limitaciones, se han desarrollado diferentes tipos de modelos de ratones transgénicos disponibles para las pruebas preclínicas de inmunogenicidad.

En primer lugar, se han desarrollado modelos de ratones transgénicos que expresan la proteína humana de interés y que son, por lo tanto, tolerantes a la misma (76-80). Esto permite que los mecanismos que desencadenan la formación de ADAs sean similares a los que ocurren en humanos y brinda un modelo útil para realizar predicciones de nuevos epitopes en proteínas modificadas o para llevar adelante estudios de inmunogenicidad comparativa entre diferentes productos o de ruptura de tolerancia (81). Sin embargo, a pesar de que estos animales transgénicos constituyen una mayor aproximación *in vivo* que los ratones salvajes o *wild type*, presentan una limitación en cuanto a su capacidad de imitar la presentación antigénica humana, debido a la falta de homología entre las moléculas del CMH-II de ambas especies.

Para resolver este inconveniente, se han desarrollado ratones transgénicos a los que se les ha eliminado el sistema de presentación antigénica murino y en su lugar expresan diversos alelos del HLA. Las moléculas del HLA de clase II están codificadas por genes localizados en el brazo corto del cromosoma 6 y se expresan como heterodímeros en la superficie celular, conformadas por una cadena α y otra cadena β . Cada cadena contiene dos dominios globulares extracelulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$). En el ser humano, las moléculas del CMH-II son codificadas por tres grupos de genes altamente polimórficos: HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR; y su expresión ocurre de manera codominante en la superficie celular. Se ha demostrado que las moléculas del HLA-DR tienen una mayor participación en la presentación antigénica a células T (82). Además, la susceptibilidad hacia numerosas enfermedades de etiología autoinmune está asociada con los alelos HLA-DQ y HLA-DR. Por ejemplo, se ha visto que la artritis reumatoidea y la EM se encuentran fuertemente asociada con los alelos del locus DRB1, mientras que la diabetes

muestra una asociación mayor con los alelos DQB1 (83, 84). Este hecho no resulta sorprendente teniendo en cuenta el elevado grado de polimorfismo genético de las moléculas del HLA, las cuales cumplen un rol esencial en la selección del repertorio de células T en el timo y en la presentación antigénica en la periferia (83). Por este motivo, para el estudio de la inmunogenicidad de las proteínas terapéuticas, se han desarrollado diferentes cepas de ratones transgénicos que expresan algunos de los alelos más frecuentes del HLA-DR: HLA-DR1 (DRB1*0101), HLA-DR3 (DRB1*0301) y HLA-DR4 (DRB1*0401), entre otras. En efecto, se ha demostrado que los péptidos presentados por las moléculas del HLA de clase II en estos ratones son similares a aquellos identificados en pacientes que expresan dichos alelos (85).

Objetivos

Objetivo General

El objetivo general del presente plan consiste en el análisis de la inmunogenicidad de proteínas terapéuticas recombinantes producidas en nuestro laboratorio y en la producción de nuevas variantes con inmunogenicidad reducida, sin producir un impacto negativo en su estructura y función biológica.

Objetivos Específicos:

- 1- Evaluar la inmunogenicidad del IFN- β -1a mediante ensayos de estimulación de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con esclerosis múltiple tratados o no con IFN- β -1a, y la activación específica de linfocitos T, por medio de citometría de flujo.
- 2- Realizar un análisis *in silico* que permita identificar las regiones potencialmente inmunogénicas de la proteína y los cambios puntuales que conducirían a una reducción de la inmunogenicidad de estas regiones, sin producir un impacto negativo en la estructura y función de la proteína.
- 3- Validar las predicciones realizadas mediante técnicas experimentales, de manera tal de identificar las modificaciones que efectivamente producen reducción de la inmunogenicidad, y diseñar posibles variantes que las contengan, en distintas combinaciones (variantes de-inmunizadas).
- 4- Producir las variantes de-inmunizadas en células animales, purificarlas y evaluar la actividad biológica y la inmunogenicidad mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Materiales y Métodos

1. DESARROLLO DE VARIANTES DE-INMUNIZADAS DE IFN- β -1a MEDIANTE ALGORITMOS DE PREDICCIÓN IN SILICO

Para el estudio de la inmunogenicidad de las variantes de-inmunizadas de IFN- β -1a se utilizó el conjunto de herramientas provisto por la compañía *EpiVax Inc.* (Providence, Rhode Island, Estados Unidos), institución líder y pionera en el análisis de la inmunogenicidad de proteínas con fines terapéuticos. Estas herramientas permiten modelar de forma precisa la interacción CMH-epitope y predecir la inmunogenicidad de las secuencias peptídicas.

La primera etapa del proceso de de-inmunización consistió en el análisis de la inmunogenicidad global de la citoquina, por medio de una metodología previamente descrita (86). Para esto, la secuencia de IFN- β -1a fue analizada en base a péptidos consecutivos de 9 aminoácidos de longitud y solapados en 8 residuos. El potencial inmunogénico de cada péptido fue evaluado frente a un panel de ocho alelos arquetípicos del HLA Clase II (DRB1*0101, DRB1*0301, DRB1*0401, DRB1*0701, DRB1*0801, DRB1*1101, DRB1*1301 y DRB1*1501) que representan el 90% de la diversidad de moléculas del CMH-II en la población humana mundial (70).

El *software* asigna luego un valor “Z” a cada uno de estos péptidos. Aquellos péptidos cuyo valor Z es superior a 1,64 en la escala Z de *EpiMatrix* (aproximadamente el 5% del set de péptidos) presentan una probabilidad significativa de unión a la molécula del CMH-II y se designan como *hits*. Los péptidos que presentan valores “Z” superiores a 2,32 en la escala (el 1% del total) presentan muy alta probabilidad de unión. La mayoría de los epitopes T publicados se encuentran dentro de esta categoría. De esta manera, *EpiMatrix* asigna un *score* de inmunogenicidad global a IFN- β -1a, ubicándola en una escala normalizada que permite establecer comparaciones con otras proteínas inmunogénicas.

Posteriormente, por medio de la herramienta *ClustiMer*, se agruparon los péptidos con mayor potencial inmunogénico en regiones (o *clústers*), de entre 15 y 25 aminoácidos (87).

Finalmente, el análisis de la contribución individual de cada aminoácido a la inmunogenicidad total de cada péptido fue llevado a cabo por medio de la herramienta *OptiMatrix*. Esta herramienta realiza una búsqueda de aquellos residuos críticos en la unión a los distintos alelos HLA. Luego, reemplaza en forma iterativa cada aminoácido por los 19 restantes y en cada caso realiza una evaluación de la inmunogenicidad potencial resultante. El

análisis incluye, además, un “apilamiento” de secuencias homólogas a la de interés, de manera tal de realizar cambios conservativos o naturales en la molécula.

Por otra parte, los residuos esenciales desde el punto de vista de la estructura/función de IFN- β fueron previamente identificados mediante una minuciosa búsqueda bibliográfica (88). Además, se evitó mutar aquellos residuos que naturalmente se hallaban fuertemente conservados (funcional/estructuralmente importantes), para lo cual se realizó un alineamiento múltiple de secuencias homólogas al IFN- β -1a, seleccionadas de la base de datos no redundante (nr) del NCBI empleando el algoritmo de MAFFT (89). Posteriormente se analizó la estabilidad de cada variante a partir del cálculo de la diferencia de energía libre de Gibbs ($\Delta\Delta G$), la cual se determinó empleando el software dg_monomer4 implementado en el paquete Bioinformático *Rosetta5* (90-92). Este programa estima la diferencia de pseudo-energías definidas por *Rosetta* entre la estructura de tipo salvaje y la estructura mutante puntual. Más precisamente, se generaron 50 modelos de cada una de las estructuras mutantes y de tipo salvaje, y el $\Delta\Delta G$ más preciso se determinó como la diferencia entre la media de las 3 estructuras de tipo salvaje con la puntuación más alta y las tres mutantes con la mayor puntuación. *Rosetta* sigue la convención de que los valores negativos de $\Delta\Delta G$ indican una mayor estabilidad, es decir, $\Delta\Delta G$ = energía mutante - energía de tipo salvaje. El alineamiento múltiple de secuencias homólogas al IFN- β -1a así como el análisis de la estabilidad de cada variante en función de sus diferencias de energía libre de Gibbs se llevó a cabo en colaboración con el Dr. Alberto Sergio Garay, en el Laboratorio de Modelado Molecular, perteneciente a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas – UNL.

Una vez establecidas las modificaciones a realizar sobre cada *clúster*, éstas fueron introducidas de manera secuencial, generándose así las secuencias de las variantes de inmunizadas correspondientes.

2. REACTIVOS Y SOLUCIONES

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

3. LÍNEAS CELULARES

HEK 293T/17 (Human Embryonic Kidney) (93): obtenida de la American Type Culture Collection® (ATCC) (CRL-11268, EEUU.). Es un clon de la línea celular HEK derivada de riñón de embrión humano que expresa constitutivamente el antígeno T grande del virus de simio 40 (SV40); el clon 17 fue seleccionado específicamente por su alta facilidad de ser transfectado. Se utilizó para el ensamblado de partículas lentivirales necesarias para el proceso de transducción (sección 6.5.1).

CHO-K1 (Chinese Hamster Ovary) (94): obtenida de la ATCC (CCL-61, EE. UU.). Es un clon de la línea celular CHO derivada de ovario de hámster chino adulto que se empleó como huésped para la expresión de las diferentes variantes de-inmunizadas de IFN- β (sección 6.5.2).

WISH (95): obtenida de la ATCC (CCL-25™, EE. UU.). Es una línea celular epitelial adherente, derivada de tejido amniótico humana, susceptible a la infección con el virus de la estomatitis vesicular (VSV). La misma fue utilizada para la evaluación biológica de las diferentes variantes de-inmunizadas de IFN- β (sección 9.1.1).

4. MEDIOS DE CULTIVO

4.1 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 μm (Millipore, EE. UU.). Dos alícuotas de medio filtrado se incubaron durante 48 h, una de ellas a temperatura ambiente y la otra a 37 °C, como control de la esterilidad. El medio de cultivo se conservó siempre a 4 °C.

El suero fetal bovino (SFB) (PAA, EEUU) fue previamente descomplementado por incubación en baño de agua termostatzado a 56 °C durante 30 min.

Medio DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium / Nutrient Mixture F-12 (Ham); Gibco, EE. UU.): Consistió en una mezcla 1:1 (V/V) de los medios DMEM (Gibco, EE. UU.) y Ham's F-12 (Gibco, EE. UU.) suplementados con NaHCO_3 (Gibco, EE. UU.) 2,441 g/l, sulfato de gentamicina (Calbiochem, EE. UU.) 0,05 mg/g y glutamina (Gibco, EE. UU.) 1,1 g/l.

Las concentraciones de SFB empleadas para suplementar el medio fueron de 5% o 0,5% V/V, en función de la etapa de la experiencia en la que se haya utilizado.

Este medio se empleó para el cultivo de las líneas celulares recombinantes CHO-K1, productoras de las diferentes variantes de IFN- β .

Medio DMEM para HEK (Invitrogen, EE. UU.): se empleó para el cultivo de la línea celular HEK 293T/17. Para ello, fue suplementado con NaHCO₃ 1,5 g/l, piruvato de sodio (Gibco, EE. UU.) 0,11 g/l SFB 10% (V/V) y sulfato de gentamicina 0,05 mg/ml.

Medio MEM (Minimun Essential Medium, Gibco, EE. UU.): se empleó para el crecimiento de células WISH. Fue suplementado con glutamina 2 mM, NaHCO₃ 2,2 g/l, sulfato de gentamicina 0,05 mg/ml y SFB 10% (V/V) o 2% (V/V).

Medio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute; Gibco, EE. UU.): se empleó para el cultivo de células mononucleares de sangre periférica humana (CMSP) y células esplénicas (CE). Para preparar el medio basal se suplementó el medio RPMI 1640 con NaHCO₃ (Gibco, EE. UU.) 1,5 g/l y sulfato de gentamicina (Gibco, EE. UU.) 0,05 mg/ml. Para la preparación del medio de trabajo (medio completo), la formulación anterior se suplementó con SFB al 10% (V/V), 2 mM de solución estéril de glutamina (Sigma, EE. UU.) y 1 mM de solución estéril de piruvato de sodio (Gibco, EE. UU.). El pH se ajustó a 7,2 con NaOH 4N (Sigma, EE. UU.).

4.2 Medios de cultivo para células procariotas

Medio LB (Luria-Bertani): se utilizó para el crecimiento bacteriano en medio líquido. Composición: triptona (Sigma, EE. UU.) 10 g/l, extracto de levadura (BD, EE. UU.) 5 g/l y NaCl (Sigma, EE. UU.) 10 g/l. El pH se ajustó a 7,2 con NaOH (Sigma, EE. UU.) 4 N. El caldo LB suplementado con ampicilina (Bagó, Argentina) 100 µg/ml se utilizó para el crecimiento de clones resistentes a dicho antibiótico.

Medio agar LB: se empleó para el crecimiento bacteriano en medio sólido. Consistió en medio LB con el agregado de agar (Sigma, EE. UU.) 2% (P/V). El medio agar LB suplementado con ampicilina 100 µg/ml fue empleado para la selección de clones bacterianos recombinantes. Debido a que el antibiótico es un compuesto termolábil, se adicionó al medio estéril fundido una vez que la temperatura alcanzó aproximadamente los 50 °C. Luego de homogeneizar, se repartieron alícuotas de 15 ml en placas de Petri estériles de 10 cm de diámetro (Greiner, Austria).

Medio A: se empleó para la preparación de células competentes de *E. coli*. Está constituido por medio LB suplementado con MgSO₄·7H₂O 10 mM y glucosa 0,2% (P/V).

La esterilización de los medios de cultivo para bacterias se realizó en autoclave durante 15 min a 1 atm, a 120 °C.

5. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

5.1 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 °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 para su posterior análisis y/o purificación.

5.2 Electroforesis en geles de agarosa

Las separaciones de ADN en geles de agarosa se realizaron empleando el sistema submarino (96). Para la preparación de los geles, de concentración de agarosa 1% (P/V), se pesó la cantidad adecuada de agarosa (Biodynamics SRL, Argentina) y se disolvió en solución reguladora TAE (Tris-Acetato 40 mM pH 8, Na₂EDTA 1 mM) en horno microondas. La solución se enfrió a 60 °C y se adicionó el colorante SYBR® *Safe DNA gel stain* 10.000 X (Invitrogen, EE. UU.). Esta solución se colocó en un soporte adecuado y se introdujo un peine de 1 mm de espesor para formar los carriles de siembra, que 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 10 X [Glicerol (Cicarelli, Argentina) 30% (V/V); azul de bromofenol 0,25% (P/V)] y cuidadosamente se sembraron en cada una de las calles del gel. Se aplicó un voltaje entre 80-100 V hasta observar la adecuada migración del colorante de la solución de siembra. Finalmente, los geles fueron examinados utilizando un transiluminador *Safe Imager*™ (Invitrogen, EE. UU.) y fotografiados.

La detección de los fragmentos de ADN por medio de esta técnica es posible debido al fenómeno conocido como transferencia de energía mediante resonancia de fluorescencia. El fundamento del mismo se basa en la capacidad del colorante SYBR® de intercalarse en la estructura secundaria de la doble hélice del ADN y acoplarse energéticamente a los ácidos nucleicos que lo forman, de manera que su tasa de emisión fluorescente se incrementa notablemente. El complejo resultante ADN-SYBR presenta el pico de absorción a $\lambda=498$ nm y el pico de emisión a $\lambda=522$ 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 *Trans2K® Plus DNA Marker* y *Trans5K® Plus DNA Marker* (Sigma, EE. UU.).

5.3 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Los fragmentos de ADN separados por electroforesis en geles de agarosa se purificaron utilizando el *kit* comercial *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN, Alemania), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

La purificación se verificó analizando una alícuota mediante electroforesis en gel de agarosa. Se determinó la pureza y la concentración de los fragmentos mediante lectura espectrofotométrica (sección 5.9).

5.4 Purificación mediante precipitación de los fragmentos de ADN digeridos por endonucleasas

Los fragmentos de ADN obtenidos luego de las digestiones con enzimas de restricción fueron aislados y concentrados mediante precipitación con etanol absoluto. De esta manera fue posible eliminar los fragmentos cortos de ADN liberados, las sales y las enzimas de restricción.

Para esto, la muestra se llevó a volumen final de 250 μ l con agua MiliQ autoclavada, adicionando un volumen de acetato de sodio 3 M equivalente al 10% del volumen de la muestra. Se mezcló suavemente y se agregaron 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío, incubando a -70 °C durante 1 h. Luego, se centrifugó a 13.000 x *g* durante 15 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se lavó con 200 μ l de etanol 70% frío mediante centrifugación a 13.000 x *g*, durante 7 min a 4 °C. Se secó en estufa a 37 °C durante 10 min y el precipitado de ADN se resuspendió en un volumen de 50 μ l de agua Milli Q autoclavada.

5.5 Reacciones de ligación de ADN

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo en un volumen de 20 μ l, utilizando la enzima T4 ADN ligasa (Invitrogen, EE. UU.), de acuerdo con el protocolo indicado por el proveedor. Para la ligación de insertos con el vector pLV-pLK se utilizó una relación inserto/plásmido 5:1. La mezcla de reacción se incubó durante toda la noche a 4 °C. Se realizó un control de plásmido religado, reemplazando el volumen correspondiente al inserto por agua autoclavada.

5.6 Preparación de células competentes

Para la preparación de células competentes se realizó una estría de *Escherichia coli* TOP10, obtenidas de un stock conservado a -70 °C, sobre una placa con agar LB. Se cultivaron

durante 16-20 h a 37 °C. Se escogió al azar una de las colonias desarrolladas y se inoculó en 5 ml de caldo LB (cultivo inóculo), realizándose una nueva incubación a 37 °C durante 18 h con agitación a 180 rpm. Se realizó un repique del cultivo en una dilución 1:100 en 100 ml de medio A y se incubó a 37 °C en agitación a 180 rpm durante 2 h. Posteriormente, las células fueron trasvasadas asépticamente a un tubo de centrifuga estéril, enfriado previamente, e incubadas durante 15 min en baño de hielo. Las bacterias se cosecharon mediante centrifugación a 4 °C y 1.500 rpm durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 1 ml de medio A frío. A esta suspensión se le adicionaron 5 ml de solución de conservación [medio LB conteniendo glicerol 36% (P/V); PEG 12% (P/V) (MW7500); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 12 mM, esterilizado por filtración con membrana de 0,22 μm] y se mezcló suavemente. Finalmente, la suspensión celular fue dispensada en alícuotas de 50 μl en criotubos fríos (Greiner, Austria), los cuales fueron conservados a -70 °C hasta su utilización. El medio de cultivo utilizado para la preparación de las células competentes, rico en nutrientes, favorece la generación de poros en la pared celular bacteriana y, en consecuencia, la introducción del ADN plasmídico durante la transformación. La triptona y el extracto de levadura aportan el nitrógeno y los factores de crecimiento necesarios para la replicación y recuperación bacteriana luego del proceso de transformación. La glucosa incrementa la tasa de crecimiento y el sulfato de magnesio provee los iones Mg^{2+} , necesarios para las reacciones enzimáticas que permiten la replicación del ADN y eleva la eficiencia de transformación.

Para asegurar la esterilidad del cultivo y estimar la eficiencia de transformación se realizó un control de las células competentes preparadas. Para ello, las bacterias competentes, una vez conservadas durante al menos 16 h a -70 °C, se descongelaron 2 criotubos: uno de ellos se transformó con 100 ng de un vector con resistencia para ampicilina (control positivo) y el otro fue sometido al mismo procedimiento, pero sin el agregado de ADN (control negativo). Finalizada la transformación, las células fueron distribuidas homogéneamente en placas de cultivo conteniendo agar LB y antibiótico ampicilina. Las células competentes fueron utilizadas sólo cuando la placa del control negativo no mostró desarrollo de colonias y cuando se obtuvo una eficiencia de transformación superior a 10^6 UFC/ μg de ADN en el control positivo.

5.7 Transformación de células competentes

Para realizar la transformación bacteriana se descongelaron 50 μl de células competentes y se mezclaron con el ADN (mezcla de ligación, sección 5.5, o plásmido control), incubando durante 30 min en baño de hielo. Posteriormente, la mezcla se colocó en un baño a

42 °C durante 2 min y se transfirió inmediatamente a hielo durante otros 2 min. Se adicionaron 700 µl de medio LB (sin antibiótico) y se incubó durante 60 min a 37 °C con agitación a 180 rpm, con el propósito de permitir la recuperación de las bacterias de la situación de estrés a la cual fueron sometidas. Las células se cosecharon mediante centrifugación a 2.500 x g durante 5 min a temperatura ambiente, se descartaron 600 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, que permite seleccionar las bacterias transformadas. Se incubó durante 16 h a 37 °C.

5.8 Preparación de ADN plasmídico

5.8.1 Minipreparación

Con el propósito de obtener los vectores lentivirales que contengan las secuencias codificantes de las variantes de IFN- β -1a con una pureza y concentración adecuadas para realizar su secuenciación, 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, EE. UU.), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

5.8.2 Maxipreparación

Con el propósito de obtener cantidades suficientes de los vectores lentivirales para su empleo en el procedimiento de transfección de células eucariotas, se realizaron preparaciones de ADN plasmídico en gran escala (maxiprep), empleando el método de lisis alcalina (96).

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 pre-cultivo 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 200 ml de medio LB y se incubó durante 16-20 h en las mismas condiciones.

Los cultivos se centrifugaron a 5.000 rpm 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 M; 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 5 min en hielo y se centrifugó a 5.000 rpm 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 (J.T. Baker, EE. UU.), incubando 15 min a -70 °C. Se centrifugó a 5.000 rpm durante 20 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante 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 14.000 rpm 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 14.000 rpm 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 14.000 rpm durante 10 min y se conservó la fase acuosa (superior). A ésta se le adicionó 1 volumen de isopropanol, se agitó y se incubó durante 20 min a -70 °C para precipitar el ADN. Se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 min a 4 °C y el precipitado se lavó con 100 µl de solución IV centrifugando durante 5 min a 14.000 rpm. 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, EE. UU.) 100 µg/ml. 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 20 min a -70 °C, con el fin de precipitar el ADN plasmídico. Se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 min a 4 °C. El precipitado se lavó con 100 µl de solución IV y se dejó secar a 37 °C en estufa. Finalmente, se resuspendió con 300 µl de agua Milli Q estéril.

Finalmente, se evaluó la integridad de los plásmidos mediante electroforesis en gel de agarosa (sección 5.2) y se determinó la concentración y pureza mediante lectura de absorbancia a longitudes de onda de 260 nm y 280 nm (sección 5.9).

5.9 Determinación de la concentración y pureza del ADN

Los ácidos nucleicos absorben luz ultravioleta debido a la presencia de bases aromáticas nitrogenadas a lo largo de 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 de ADN doble cadena (ADNdc).

La concentración y pureza de los plásmidos (Concentración de ácido nucleico, C_{an}) se determinó por medida de su absorbancia a $\lambda=260$ nm y $\lambda=280$ nm en espectrofotómetro UV-visible (Ultrospec2100pro Healthcare, Reino Unido), según las ecuaciones 1 y 2 (96).

$$C_{an} (\mu g/ml) = A_{260nm} * f \left(\frac{\mu g}{ml \cdot DO} \right) Dil^{-1} \quad (1)$$

$$Pureza = \frac{A_{260nm}}{A_{280nm}} \quad (2)$$

En la ecuación (1) el valor de f es igual a 50 µg/ml.DO para ADN. El valor de pureza de la ecuación (2) debe estar comprendido en el rango de 1,8 a 2,0. Por fuera del mismo, la solución no es considerada apta para su uso en transfección de células eucariotas, ya que posee una cantidad considerable de contaminantes (proteínas, reactivos utilizados en la extracción, entre otros) que podrían afectar la eficiencia de la misma.

5.10 Construcción de los plásmidos pLV-PLK conteniendo las variantes de IFN- β -1a

Los vectores lentivirales conteniendo cada una de las variantes de IFN- β -1a fueron generados mediante el clonado de las secuencias correspondientes (contenidas inicialmente en plásmidos pUC57-Amp) en vectores pLV-PLK. Estos últimos poseen las siguientes características:

- » un origen de replicación bacteriano (ORI);
- » un gen que otorga resistencia a ampicilina;
- » un sitio de múltiple clonado, corriente abajo del promotor temprano de citomegalovirus (CMV);
- » un gen que codifica para la enzima puromicina N-acetiltransferasa dirigido por el promotor SV40, para la selección de células eucariotas con el antibiótico puromicina;

- » la presencia de una región RRE, altamente estructurada, que actúa como sitio de unión de 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 marmota (WPRE);
- » 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 (5' LTR y 3' LTR).

Con el objetivo de realizar el clonado de las secuencias de las diferentes variantes de IFN- β -1a en los vectores pLV-PLK, se transformaron células competentes (sección 5.7) con los plásmidos conteniendo los productos de síntesis obtenidos de la empresa *GeneUniversal*. Las bacterias transformadas fueron sembradas en placas conteniendo medio LB-agar suplementado con ampicilina, de manera que sólo crezcan aquéllas que incorporaron el plásmido. Se eligieron al azar dos clones por cada variante, se realizó minipreparación de ADN (sección 5.8.1) y posterior digestión con las enzimas de restricción *XbaI* y *Sall*, para liberar el inserto correspondiente. Los productos de digestión se analizaron en un gel de agarosa, a partir del cual se purificaron las bandas correspondientes a los fragmentos codificantes para las moléculas de IFN- β -1a con sus respectivos péptidos de señalización (590 pb). Al mismo tiempo, se realizó la digestión del plásmido pLV-PLK con las mismas enzimas de restricción (*XbaI* y *Sall*) y se purificó mediante precipitación con etanol absoluto (sección 5.4). Las concentraciones del vector y de los fragmentos digeridos y purificados se determinaron por lectura espectrofotométrica (sección 5.9). Ambos productos fueron empleados para realizar la reacción de ligación (sección 5.5) que se utilizó para la posterior transformación bacteriana.

Las bacterias transformadas fueron sembradas en placas conteniendo medio LB-agar suplementado con ampicilina como agente de selección. A partir de cada placa se realizó un ensayo de PCR en colonia para 2 clones bacterianos, empleando los oligonucleótidos LV-rev (5'-ATAGCATGATACAAAGGCAT-3') y CMV-Fw (5'-CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3'), que permiten

amplificar un fragmento de aproximadamente 1.000 pb que contiene la secuencia completa de cada una de las variantes de IFN- β .

Por último, se realizó la secuenciación automática del ADN plasmídico de los clones positivos (solicitado a la empresa *Macrogen*, Corea del Sur) a fin de asegurar una correcta secuencia génica de las variantes, que permita su empleo en las etapas posteriores del proceso. Para esto se emplearon los oligonucleótidos LV-rev y CMV-Fw.

A partir de las bacterias transformadas con los vectores de cada variante pLV-PLK-IFN- β -1a, se realizaron maxipreparaciones (sección 5.8.2) de modo de obtener una cantidad adecuada de ADN plasmídico que permita llevar a cabo el proceso de transfección (sección 6.5.1). Se corroboró la liberación del inserto y la integridad del ADN plasmídico de las preparaciones mediante digestiones y electroforesis en geles de agarosa y se conservaron a -20 °C hasta su empleo.

5.11 Criopreservación de células bacterianas

Para la conservación de bacterias se procedió a cultivarlas durante 18 h a 37 °C en medio LB (cepas no transformadas) o medio LB suplementado con ampicilina (cepas recombinantes). Posteriormente, se tomaron 800 μ l del cultivo y se adicionaron 200 μ l de glicerol 50% (V/V) estéril (Cicarelli, Argentina), homogeneizando para asegurar su distribución. Finalmente, fueron conservadas a -70 °C en criotubos.

5.12 Revitalización de cepas bacterianas

Para recuperar las bacterias congeladas se obtuvo una pequeña porción de material criopreservado y se inoculó en medio LB o medio LB-antibiótico para bacterias recombinantes. Luego, el criotubo se conservó nuevamente a -70°C y el tubo inoculado se incubó a 37 °C durante 16 h.

6. TÉCNICAS DE CULTIVO DE CÉLULAS ANIMALES

6.1 Condiciones de cultivo de células eucariotas

El cultivo de las células se realizó, en todos los casos, en las condiciones estándar para células animales: estufa gaseada (Nuair, EE. UU.) a 37 °C, atmósfera de CO₂ al 5% y saturada de humedad.

6.1.1 Cultivo de células adherentes

Para el cultivo en adherencia de las líneas de células CHO-K1 recombinantes productoras de las diferentes variantes de IFN- β -1a y de las células HEK 293T/17 y WISH, se emplearon frascos T triples (Nunc, ThermoFisher, EE. UU.) de 500 cm² de superficie, manteniendo una relación constante de 0,4 ml de medio de cultivo por cada cm² de superficie, de acuerdo con lo establecido por Freshney (97).

Los cultivos que crecen adhiriéndose a una superficie sólida (sustrato) forman una monocapa. Para realizar sub-cultivos se requiere el uso de proteasas con el fin de liberar las células del sustrato sobre el que se encuentran ancladas. Para tal fin, se procedió a retirar el sobrenadante de cultivo y lavar la monocapa con una solución de tripsina-EDTA, compuesta por tripsina (Gibco, EE. UU.) 0,05% (P/V) y Na₂EDTA (Gibco, EE. UU.) 0,02% (P/V) en solución reguladora de fosfato salino [PBS: KH₂PO₄ (Sigma, EE. UU.) 0,6 g/l; Na₂HPO₄ (Sigma, EE. UU.) 0,78 g/l; NaCl 8,8 g/l; 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 μ l 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. El proceso de desorción de las células fue controlado por observación al microscopio, y cuando las células estuvieron despegadas (verificado por su forma redondeada) se homogeneizó la suspensión cuidadosamente con pipeta durante unos segundos. Posteriormente, se adicionó el medio de cultivo suplementado con SFB para neutralizar la acción de la tripsina y se homogeneizó la suspensión celular. Se tomó una alícuota para su recuento y con este resultado se realizó la dilución correspondiente con medio de cultivo fresco.

6.1.2 Cultivo de células en suspensión

Los sistemas empleados para el cultivo en suspensión de las CMSP y CE, fueron placas multipozo (MW) de poliestireno (Greiner, Austria) de 6 y 96 pozos con una superficie de 9,6 y 0,4 cm² por pozo, respectivamente.

Para realizar los cambios de medio, las suspensiones celulares se centrifugaron 20 min a 200 x g en una centrífuga Eppendorf 5403, rotor 16A4-44. Se descartó el sobrenadante de cultivo y los *pellets* celulares se resuspendieron en el medio fresco correspondiente.

6.2 Determinación de la concentración celular

Todos los recuentos celulares se realizaron en cámara de Neubauer, excluyendo del recuento aquellas células apoptóticas y muertas por el método de exclusión con azul de tripán (Gibco, EE. UU.) (98). Esta técnica se basa en el hecho de que las células viables no captan ciertos colorantes, a diferencia de las células apoptóticas y muertas, cuya membrana plasmática se encuentra alterada, permitiendo el ingreso del colorante al citoplasma.

Para realizar el recuento, una alícuota de 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 esperada de la muestra. Al realizar los recuentos, se contaron las células viables (refringentes) y las muertas (azules) contenidas en cada uno de los cuadrantes de los extremos (Nº de células contadas).

La concentración de células viables o muertas (X) se determinó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$X \left(\frac{\text{cél}}{\text{ml}} \right) = \frac{N \text{ (cél)}}{4} D \cdot 10^4 (\text{ml}^{-1}) \quad (3)$$

Donde N es el número de células contadas y D es la inversa de la dilución ($D=1/d$).

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

$$\text{Viabilidad (\%)} = \frac{x_V}{x_T} * 100 \quad (4)$$

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

6.3 Criopreservación de líneas celulares animales

Cuando se ha obtenido una línea celular con las características deseadas y libre de contaminación, es esencial su adecuada conservación. La criopreservación constituye un método eficaz de conservación de células que garantiza el mantenimiento de sus propiedades metabólicas y funcionales iniciales (97).

El daño celular inducido por el congelamiento y descongelamiento es causado por la formación de cristales de hielo intracelulares y por efectos osmóticos (99). La adición de un

agente crioprotector, como el glicerol o el dimetil sulfóxido (DMSO) (100), y el empleo de una velocidad lenta de enfriamiento, aproximadamente 1 °C/min (101), minimizan dichos efectos.

La conservación de las líneas se realizó en nitrógeno líquido, ya que a temperaturas de -196 °C se observan deterioros celulares mínimos (102). Se empleó una técnica de enfriamiento gradual desde temperatura ambiente hasta -196 °C. Para ello, una vez realizado el recuento, suspensiones celulares de densidad adecuada y en fase de crecimiento exponencial se centrifugaron a 200 x *g* durante 5 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en una solución de SFB y DMSO (Sigma, EE. UU.) en una relación 9:1 (V/V), de manera de obtener una concentración de $2 \cdot 10^6$ cél. viables/ml. La suspensión celular se distribuyó a razón de 1 ml por criotubo (Greiner, Austria). Estos criotubos fueron guardados en un contenedor comercial apropiado, MrFrosty (Nalgene, EE. UU.), y llevados a freezer de -80 °C por 24 h. El dispositivo contenedor tiene en su interior alcohol isopropílico, que permite que dentro del MrFrosty la temperatura disminuya a razón de 1 °C/min. De esta forma se logra un enfriamiento gradual de la suspensión celular, dando lugar a una correcta revitalización de las mismas cuando así se desee.

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

6.4 Descongelamiento de líneas celulares animales

La descongelación rápida 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 conteniendo 30 ml de medio de cultivo basal y se centrifugó a 200 x *g* durante 5 min a temperatura ambiente. Esta etapa se realizó con el objeto de diluir rápidamente el DMSO y luego eliminarlo, ya 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 para evaluar la concentración y la viabilidad celular (sección 6.2).

6.5 Generación de las líneas celulares productoras de las variantes de IFN- β -1a

6.5.1 Producción de partículas lentivirales mediante transfección de células HEK-293T/17

Los vectores derivados de la familia Retroviridae (vectores retrovirales), entre ellos los lentivirales, son de especial interés porque convierten sus genomas de ARN en ADN y los integran en los cromosomas de las células blanco (103, 104). Gran parte de los vectores lentivirales conocidos se han construido a partir del conocimiento sobre el genoma del virus HIV-1 y posteriormente han sido mejorados con el fin de optimizar su seguridad e infectividad, constituyendo vectores de segunda y tercera generación (105). Estos vectores poseen la capacidad de transferir elementos genéticos complejos, tales como secuencias policistrónicas o intrones, presentan un perfil de sitios de integración potencialmente seguro y un sistema relativamente sencillo para la manipulación y producción del vector.

En particular, los vectores lentivirales de tercera generación empleados en este trabajo, poseen las siguientes propiedades:

- » Están pseudotipados con la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G). Esta proteína presenta una mayor estabilidad que la glicoproteína de envoltura del HIV-1 y además incrementa el tropismo del vector, permitiendo así la transducción de un conjunto de células marcadamente mayor, incluso células no animales.
- » No poseen determinadas proteínas virales accesorias (Vif, Vpu, Vpr o Nef) que son esenciales para una eficiente propagación y virulencia del HIV-1 en células primarias o *in vivo*.
- » Presentan delecciones clave en su genoma que resultan en una inactivación transcripcional de los genomas virales potencialmente empaquetables en la célula transducida.
- » El promotor natural del HIV-1 es remplazado por secuencias promotoras heterólogas.

Para su construcción, se emplea una estrategia de co-transfección de células HEK-293T/17 con cuatro plásmidos que codifican las proteínas anteriormente mencionadas. Puesto que los elementos del vector se encuentran distribuidos en cuatro plásmidos diferentes, se requieren al menos tres eventos de recombinación para generar virus similares al HIV-1 con capacidad replicativa; y si esto ocurriera, las partículas generadas tendrían sólo tres de los nueve genes del HIV-1. De esta manera, la manipulación de estos vectores contempla un nivel adecuado de bioseguridad.

En el presente trabajo, las partículas lentivirales utilizadas en el proceso de transducción fueron generadas mediante co-transfección de células de la línea HEK-293T/17 con los siguientes cuatro plásmidos:

1. pREV, expresado durante el empaquetamiento para inducir la exportación nuclear del vector de transferencia;
2. pVSV-G, que codifica la proteína G de envoltura del VSV, necesaria para la entrada de la partícula lentiviral en la célula;
3. pMDL, que codifica las proteínas de matriz y cápside, expresadas como poliproteína gag, capaz de empaquetar el vector de expresión, y poliproteína pol, que da lugar a una proteasa, una transcriptasa reversa y una integrasa, requeridas para el clivaje de los elementos estructurales y para el procesamiento del genoma-vector durante el proceso de integración al genoma celular;
4. plásmido de transferencia pLV-PLK, que codifica la proteína de interés (variantes de IFN- β -1a) y confiere a las células resistencia a puromicina.

Para la co-transfección se utilizó la técnica de lipofección con lípidos catiónicos (105), utilizando en este caso el reactivo comercial Lipofectamina 2.000TM (Invitrogen, EE. UU.). En soluciones acuosas, los lípidos catiónicos forman pequeñas vesículas (liposomas) cargadas positivamente que interaccionan con las cargas negativas del ADN formando complejos. Éstos a su vez presentan elevada afinidad por las membranas citoplasmáticas y pueden ser incorporadas por vía endocítica al interior de las células. Debido a que los complejos ADN/lipofectamina evitan la vía lisosomal, el ADN no se ve afectado. De esta manera, la lipofección constituye una técnica simple y apropiada para transfecciones transitorias y estables de muchos tipos de líneas celulares.

El protocolo empleado consistió en cultivar las células HEK-293T/17 a una densidad de $4 \cdot 10^5$ cél/ml en placas de 10 cm de diámetro (Greiner, Austria), empleando medio DMEM para HEK suplementado con SFB 10% (V/V). Luego de 24 h de incubación, se llevó adelante el procedimiento de lipofección, para lo cual se prepararon 2,5 ml de medio DMEM para HEK sin SFB conteniendo 2,5 μ g de pREV; 3,6 μ g de pVSV-G; 6,5 μ g pMDL y 10 μ g del plásmido de transferencia. Por otro lado, se mezclaron 2,5 ml de medio DMEM para HEK sin SFB con 50 μ l de Lipofectamina 2.000TM (Invitrogen, EE. UU.; 1 mg/ml). El contenido de ambos tubos cónicos se mezcló gota a gota para favorecer la formación homogénea de los complejos lípido-ADN. Posteriormente se retiró el sobrenadante de las placas de cultivo conteniendo las células HEK-293T/17 y se adicionó el volumen de 5 ml de la mezcla lípido-ADN. Luego se incubó en las mismas condiciones de cultivo durante al menos 4 h. Al cabo de este tiempo, el cultivo se suplementó con 5 ml de medio DMEM para HEK SFB 20% (V/V), de modo de obtener una concentración final de SFB de 10% (V/V).

Luego de 48 h postransfección se cosechó el sobrenadante del cultivo conteniendo las partículas lentivirales y se centrifugó a $100 \times g$ durante 8 min a temperatura ambiente para

eliminar las células que pudieran haberse desprendido de la monocapa al retirar el medio de cultivo. El sobrenadante de la centrifugación se fraccionó en microtubos (1 ml) y se almacenó a -70 °C hasta su utilización, asegurando así el mantenimiento del título viral y de la actividad.

Todos los vectores de empaquetamiento fueron generados y preparados previamente en el laboratorio.

6.5.2 Transducción de células CHO-K1

Con el objetivo de obtener líneas celulares estables productoras de las variantes de IFN- β -1a, se llevaron a cabo transducciones de células CHO-K1, empleando partículas lentivirales conteniendo los genes de interés. Esta técnica constituye un proceso altamente eficiente en el cual el transgen se integra establemente en el genoma de las células en estado de división y no división.

Para realizar la transducción, las células CHO-K1 se cultivaron en placas de 6 pozos a una densidad de 3.104 cél/ml en medio DMEM/F-12 suplementado con SFB 5% (V/V). Transcurridas 24 h, se removi6 el sobrenadante de cultivo y se adicion6 1 ml de la cosecha de partículas lentivirales. Se incubaron las células en estas condiciones durante otras 24 h y posteriormente el medio conteniendo las partículas lentivirales fue removido y remplazado por 3 ml de medio DMEM/F-12 suplementado con SFB 5% (V/V).

Luego de 72 h, las células transducidas se subcultivaron para continuar con las siguientes etapas del proceso.

6.6 Presión de selección con antibiótico de las líneas celulares productoras de las variantes de IFN- β -1a

Las células CHO-K1 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 a una densidad de 2.10⁵ cél/ml, empleando medio DMEM/F-12 suplementado con SFB 5% (V/V) y conteniendo una determinada cantidad de antibiótico. Se comenzó la presión con una concentración de puromicina de 10 μ g/ml, analizando posteriormente el crecimiento celular y las concentraciones de IFN en el sobrenadante de cultivo. De acuerdo a los resultados obtenidos, se continuó con la selección empleando 20 μ g/ml 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 6.3).

7. PRODUCCIÓN DE LAS VARIANTES DE IFN- β -1a

La producción de las diferentes proteínas a una escala mayor, con el objetivo de obtener la cantidad necesaria de cada variante para la realización de los ensayos de caracterización posteriores, se realizó en condiciones de adherencia empleando frascos T de 125 cm² de superficie. Las líneas celulares obtenidas luego de la presión con 200 μ g/ml de puromicina se inocularon a una concentración de $2 \cdot 10^5$ cél/ml en medio de cultivo DMEM/F-12 suplementado con SFB 5% (V/V). Cuando las células alcanzaron la fase estacionaria, se cosechó el sobrenadante de cultivo cada 48 h o 72 h, reemplazándolo por medio de cultivo DMEM/F-12 suplementado con SFB 0,5% (V/V). La reducción del porcentaje de SFB respecto al medio de crecimiento se realizó para facilitar la posterior purificación de las proteínas de interés, siendo a la vez suficiente para asegurar la correcta adhesión de las células al sustrato.

Los sobrenadantes de cultivo fueron centrifugados durante 10 min a 200 x *g* y conservados a 4 °C para su posterior purificación. Este procedimiento se repitió hasta obtener 12 cosechas de cada variante.

Se tomó una alícuota de cada cosecha para analizar la concentración de cada variante de IFN- β -1a mediante ELISA sándwich (sección 7.1).

7.1 Cuantificación de las variantes de IFN- β -1a en sobrenadantes de cultivo mediante ELISA sándwich

Para realizar la cuantificación de las diferentes variantes de IFN- β -1a presentes en las cosechas se empleó el método de ELISA sándwich. Como anticuerpo de captura se utilizó el anticuerpo monoclonal (mAb) clon 2C12 obtenido previamente en el laboratorio. Además, como anticuerpo de detección se empleó un suero policlonal (pAb) de conejo anti-IFN- β -1a. Todos los reactivos disponibles en el laboratorio fueron obtenidos empleando el rhIFN- β -1a (Gema Biotech, Argentina) como inmunógeno.

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

El ensayo de ELISA sándwich se basó en la captura de las distintas variantes de IFN- β -1a por parte del mAb 2C12 inmovilizado sobre placas de poliestireno y su posterior reconocimiento por las inmunoglobulinas (Igs) presentes en el suero de conejo anti-IFN- β -1a. El protocolo se describe a continuación:

Sensibilización: se sensibilizaron placas de poliestireno de fondo plano de 96 pozos (Greiner, Austria) con 100 μ l del mAb 2C12 1 μ g/ml (100 ng/pozo) diluido en solución de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 50 mM pH 9,6 (solución de sensibilización). Se incubó durante 1 h a 37 °C y luego toda la noche a 4 °C.

Bloqueo: el bloqueo de los sitios de interacción inespecífica se realizó con 200 μ l/pozo de una solución de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma, EE. UU.) 1% (P/V) en PBS (solución de bloqueo). Se incubó durante 1 h a 37 °C.

Primera incubación: se agregaron 100 μ l de diluciones sucesivas 1:2 del estándar de rhIFN- β -1a desde 200 ng/ml hasta 1,5625 ng/ml, y de las muestras a analizar. Para ello se empleó una solución de BSA 0,1% (P/V) en PBS con el agregado de Tween 20 al 0,05% (V/V) (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. Se incubó durante 1 h a 37 °C.

Se realizó un control sin el agregado de IFN- β -1a, para evaluar la posible unión inespecífica de los reactivos (control negativo). Para ello, durante esta etapa se reemplazó el IFN por 100 μ l de solución diluyente.

Segunda incubación: se adicionaron 100 μ l de suero de conejo anti-IFN- β -1a diluido 1:4000 con solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37 °C.

Tercera incubación: se agregaron 100 μ l de anticuerpo de cabra anti-Igs de conejo conjugado con la enzima peroxidasa (DAKO, Dinamarca) diluido 1:2000 en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37 °C.

Reacción reveladora: el revelado se realizó mediante reacción enzimática empleando como sustrato H_2O_2 0,015 volúmenes diluida en solución de citrato/fosfato de sodio 50 mM, pH 5,3 (solución de revelado), con el agregado del cromógeno o-fenilendiamina (OPD, Sigma, EE. UU.) en una concentración de 0,5 mg/ml. Se colocaron 100 μ l por pozo de dicha solución y se incubó la placa en oscuridad y a temperatura ambiente durante 15-30 min. Una vez transcurrido el tiempo estipulado se observó la aparición de color debido a la reducción del sustrato, catalizada por la peroxidasa, con la oxidación simultánea del cromógeno. La reacción se detuvo

mediante el agregado de 50 μ l de H_2SO_4 2 N y la lectura del color se efectuó a una $\lambda=492$ nm en un lector de placas de microtitulación (Labsystems Multiskan MCC/340).

Cuantificación: se graficaron los valores de absorbancia en función de las concentraciones de rhIFN- β -1a empleado como estándar y de las diluciones de las muestras en escala logarítmica. La concentración de las muestras se determinó utilizando el ensayo de rectas paralelas (106).

8. PURIFICACIÓN DE LAS DIFERENTES VARIANTES DE IFN- β -1a MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE PSEUDO-AFINIDAD A COLORANTES Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)

Se han descrito diversos procedimientos para la purificación de interferones. Estos incluyen la cromatografía de pseudo-afinidad (107), la cromatografía de exclusión por tamaño molecular (19), la cromatografía líquida de alto rendimiento (*High Performance Liquid Chromatography* o HPLC) (108) y la cromatografía de inmutioafinidad (109, 110), entre otras. Además, se ha reportado que éstas pueden realizarse en forma combinada para lograr un mayor nivel de pureza (111, 112).

La matriz de concanavalina A-*Sepharose* fue uno de los primeros soportes de afinidad para la purificación de IFN- β . Sin embargo, los bajos rendimientos obtenidos han llevado a reemplazarla por la matriz de *Blue-Sepharose* o soportes de inmutioafinidad.

8.1 Equipamiento

Para las purificaciones se emplearon los cromatógrafos líquidos *ÄKTA Start* y *ÄKTA Purifier* (GE Healthcare, EE. UU.) 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).

8.2 Cromatografía de pseudo-afinidad a colorantes (*Blue-Sepharose*)

En primer lugar, se llevó adelante una etapa inicial de purificación/concentración de la proteína de interés. Para esto se empleó una matriz de pseudo-afinidad *Blue-Sepharose* empleando 7 ml de resina sin uso previo para el empaquetado de una columna XK 16/20 (8 cm de altura de matriz x 1,6 cm de diámetro interno; GE Healthcare, EE. UU.).

Como material de partida se utilizaron los sobrenadantes de cultivo de las variantes IFN- β -1a obtenidos a partir del cultivo de su correspondiente línea celular productora en condiciones de adherencia y su posterior conservación a 4°C. Antes de comenzar el protocolo de purificación, se acondicionó la muestra filtrándola por medio de un sistema de filtración por vacío que emplea membranas de acetato de celulosa de 0,45 μ m (Sartorius Stedim) y portafiltros de 500 y 1.000 ml de capacidad (Nalgene).

Los detalles técnicos y el procedimiento de la técnica de purificación no se informan dado que es un protocolo cedido gentilmente por una empresa y se respeta en esta instancia la confidencialidad.

8.2.1 Determinación de la concentración y pureza de las variantes de IFN- β -1a purificadas

La cuantificación de los IFNs purificados se llevó a cabo por medición espectrofotométrica a $\lambda=280$ nm y a $\lambda=400$ nm, empleando como blanco de lectura la solución de elución. De esta manera, conociendo el factor de conversión (1,6 para el paso de purificación de *Blue-Sepharose*), el cálculo de la concentración se realizó utilizando la siguiente ecuación:

$$C \left(\frac{mg}{ml} \right) = \frac{|(A_{muestra} - A_{blanco})^{280} - (A_{muestra} - A_{blanco})^{400}|}{1,6} \quad (5)$$

Para la medición se empleó un espectrofotómetro UV-visible (Ultrospec 2.000, GE Healthcare, EE.UU.) y cubetas de cristal de cuarzo.

La pureza de las proteínas se evaluó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) con posterior coloración con azul brillante de *Coomassie*.

La electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) se desarrolló siguiendo esencialmente el método descrito por Laemmli (113), utilizando para el armado del gel el sistema de electroforesis modular vertical Mini-Protean 3 (Bio-Rad, EE. UU.). Las condiciones desnaturizantes se generaron mediante el agregado del detergente iónico dodecil sulfato de sodio (SDS) en presencia de un agente reductor de enlaces disulfuro (β -mercaptoetanol).

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). Las muestras 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 hervidas durante 5 min para favorecer la desnaturalización de las moléculas, y sembradas directamente sobre el gel de apilamiento. La corrida electroforética se llevó a cabo empleando una solución de corrida (Tris 25 mM, glicina 0,2 M; SDS 0,1%), a un voltaje constante de 200 V, sumergiendo el módulo en un baño de hielo. La corrida finalizó cuando el frente de corrida alcanzó una distancia de 0,5 cm con respecto al borde inferior del gel de separación.

Luego de la corrida electroforética, para realizar la coloración con azul brillante de *Coomasie*, el gel se sumergió durante 15 min en solución de coloración [azul brillante *Coomasie* R-2500 1% (P/V), metanol 40% (V/V) y ácido acético 10% (V/V)]. Posteriormente, se decoloró con solución decolorante [metanol 7,5% (V/V) y ácido acético 5% (V/V)] hasta la aparición de bandas nítidas y disminución de la tinción de fondo. Las incubaciones con el colorante y con la solución de lavado se realizaron en agitación.

8.3 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

La matriz de *Blue-Sepharose* se ha utilizado para la cromatografía de numerosas proteínas y no es completamente específica para IFN- β . A partir de los estudios realizados a las fracciones de elución obtenidas en el primer paso de purificación se pudo detectar la presencia de proteínas contaminantes, entre ellas la albúmina sérica bovina y proteínas de menor peso molecular provenientes de las células hospedadoras, por lo que se decidió llevar a cabo un segundo paso de purificación realizando una cromatografía HPLC-fase reversa.

Este paso de purificación también fue realizado empleando un protocolo cedido gentilmente por una empresa y por este motivo no se mencionan los detalles técnicos.

8.3.1 Determinación de la concentración y pureza de las variantes de IFN- β -1a purificadas

La cuantificación de los IFN purificados se llevó a cabo por medición espectrofotométrica a $\lambda=280$ nm y a $\lambda=400$ nm empleando como blanco de lectura la solución de elución correspondiente para el segundo paso de purificación. El cálculo de la concentración se realizó utilizando la ecuación (6) donde, el factor de conversión fue 1,45:

$$C \left(\frac{mg}{ml} \right) = \frac{|(A_{muestra} - A_{blanco})^{280} - (A_{muestra} - A_{blanco})^{400}|}{1,45} \quad (6)$$

La pureza de la proteína se evaluó mediante SDS-PAGE con posterior coloración con azul brillante de *Coomassie* (Sección 8.5).

8.4 Concentración y diafiltración de las variantes de IFN-β-1a

El proceso de purificación de cada una de las variantes de IFN-β-1a se realizó en forma reiterada, hasta obtener cantidad suficiente de la proteína para la posterior determinación de sus características analíticas y funcionales, y análisis de su inmunogenicidad. Para cada proteína, las fracciones correspondientes al pico de elución de las distintas cromatografías se mezclaron y se diafiltraron contra una solución excipiente. Para ello, se emplearon columnas de filtración para centrífuga Amicon® Ultra-15 (Millipore, EE. UU.), provistas con membranas de ultrafiltración de 10 kDa. El protocolo desarrollado se describe a continuación:

Hidratación: con el objetivo de hidratar la membrana, se agregaron 12 ml de agua ultra pura a la columna de diafiltración, centrifugando luego a 5.000 rpm durante 7 min.

Concentración: en el dispositivo previamente hidratado se agregaron 12 ml de la solución de proteína, centrifugando luego a 4.000 rpm durante 15 min.

Este proceso se repitió la cantidad de veces necesarias para que el volumen final de solución sea de aproximadamente 1,5 ml. El tiempo que requiere este paso depende de cuán concentrada esté la solución (a mayor concentración, mayor tiempo) y de la cantidad de sales o compuestos que tenga la solución donde se encuentra la proteína de interés. En nuestro caso, se debieron realizar alrededor de 4 ciclos de 30 minutos para alcanzar un volumen final de 1,5 ml.

En cada evento de centrifugación se recolectó el permeado para su posterior análisis.

Diafiltración: sobre la solución previamente concentrada se agregaron 10 ml de solución excipiente, centrifugando luego a 4.000 rpm durante 15 min. Este procedimiento se repitió dos veces más. La última centrifugación se realizó durante 40 min, a fin de obtener la proteína en un volumen final de 500 µl, aproximadamente.

Regeneración de la membrana: con el objetivo de acondicionar la membrana para posteriores usos, se agregaron 12 ml de NaOH 0,1 N y se centrifugó a 5.000 rpm durante 7 min. Luego se realizó un lavado agregando 12 ml de agua y centrifugando a 5.000 rpm durante 7 min. Finalmente se agregaron 12 ml de etanol 20% V/V y se centrifugó durante 5 min. El volumen de

etanol remanente en la columna funciona como conservante de la membrana, por lo que no se descartó.

Todos los eventos de centrifugación se realizaron a 4°C.

8.5 Evaluación de la concentración y pureza de las variantes de IFN- β -1a

La cuantificación de las variantes de IFN- β -1a purificadas se llevó a cabo por medición espectrofotométrica a $\lambda = 280$ nm y a $\lambda = 400$ nm de forma similar a la descrita en la Sección 8.3.1 de este apartado y empleando el mismo blanco de lectura.

La pureza de la proteína se evaluó mediante SDS-PAGE con posterior coloración con azul brillante de *Coomassie* como se describe a continuación.

8.5.1 Análisis de la identidad de las variantes de IFN- β -1a mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) seguido de Western blot

La identidad de las distintas variantes de IFN- β -1a en el sobrenadante de cultivo de las líneas CHO-K1 productoras de cada proteína fue analizada mediante PAGE con el agregado de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) en condiciones reductoras, seguida de un procedimiento de transferencia a membranas, o *Western blot*, para llevar a cabo una reacción de inmunodetección específica de la molécula de IFN.

La electroforesis se desarrolló en base al método descrito por Laemmli (113), utilizando para el armado de los geles el sistema de electroforesis modular vertical *Mini-Protean 3* (Bio-Rad, EE. UU.). Todos los geles fueron realizados en condiciones desnaturalizantes, 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 de 5% (P/V) y un gel de separación con una concentración de acrilamida/bisacrilamida de 15% (P/V). Las muestras 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 muestra/solución de siembra de 3:1. Las muestras fueron incubadas a 100 °C durante 5 min para favorecer la desnaturalización de las proteínas, y sembradas directamente sobre el gel de apilamiento. La corrida electroforética se llevó a cabo empleando como solución de corrida: Tris 25 mM, glicina 0,2 M; SDS 0,1%, 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.

Seguidamente se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF (Bio-Rad, EE. UU.), empleando el mismo equipo de Bio-Rad (transferencia sumergida). Se utilizó un protocolo estándar de transferencia de proteínas, 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. A continuación, se realizó el bloqueo de los sitios de la membrana sin proteínas adsorbidas, por inmersión de la misma en una solución de TBS-leche descremada 5% (P/V) y Tween 0,05% (V/V) durante toda la noche.

Luego del bloqueo, se empleó una solución de pAb, suero de conejo anti-IFN- β -1a diluido 1:2000 en solución diluyente de *Western blot* [TBS-leche descremada 0,5% (P/V) con el agregado de Tween 20 0,05% (V/V)]. Dicha solución se incubó en contacto con la superficie transferida de la membrana durante 1 hora en agitación. Posteriormente, esta solución fue removida. La segunda incubación se realizó de igual manera con anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo conjugados con la enzima peroxidasa (DAKO) en una dilución 1:1000 en solución diluyente de *Western blot*. Se incubó durante 1 hora en agitación y se removió. Por último, para el revelado se empleó el kit de quimioluminiscencia ECL™ *Western Blotting Analysis System* (GE Healthcare, EE. UU.), 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 Kodak Biomax XAR Film (Kodak) 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 con 15 ml solución de TBS-Tween 20 0,05% (V/V).

9. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL Y ANALÍTICA DE LAS VARIANTES DE- INMUNIZADAS DE IFN- β

9.1 Valoración de la actividad biológica in vitro de las variantes de IFN- β -1a

El empleo de bioensayos precisos y bien caracterizados para productos biológicos es fundamental para su desarrollo como productos terapéuticos. Si bien existen numerosos análisis fisicoquímicos que proveen diversa información de interés, sólo los bioensayos permiten

cuantificar la actividad biológica (AB) inducida por una determinada proteína en células o tejidos.

Los ensayos más utilizados para la medición de la potencia biológica de los IFNs se basan en su actividad antiviral. No obstante, el descubrimiento de otras actividades biológicas de esta citoquina ha promovido el desarrollo de bioensayos que se basan en la inhibición de la proliferación celular, en la regulación de funciones celulares y en funciones inmunomoduladoras (114).

9.1.1 Actividad biológica antiviral

Los ensayos de valoración biológica antiviral (ABAV) de los IFNs cuantifican la actividad inhibitoria que ejercen estas citoquinas sobre la propagación o replicación viral (115). El procedimiento más simple y conveniente consiste en medir la capacidad del IFN para proteger a las células susceptibles del efecto citopático de un virus lítico para un rango de concentraciones de la citoquina. Existe una gran variedad de sistemas línea celular/virus; en particular, en el presente trabajo se ensayó el sistema: línea celular WISH/virus VSV.

Para realizar el ensayo, previamente puesto a punto en nuestro laboratorio (109), se utilizó el estándar internacional de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el IFN- β -1a producido en células CHO-K1 obtenido del *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC 00/572), siguiendo la metodología que se detalla a continuación.

La línea celular WISH fue cultivada en medio de crecimiento [MEM suplementado con SFB 10% (V/V)]. 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 para establecer un cultivo en monocapa. Se sembraron 100 μ l de esta suspensión celular en una placa de cultivo estéril de 96 pozos y se incubó durante 24 h a 37 °C. Se eliminó el sobrenadante de cultivo por inversión, se escurrió y se colocaron 100 μ l por pozo de diluciones sucesivas 1:2 en medio de ensayo (medio MEM suplementado con SFB 2% (V/V)) del IFN- β -1a (WT) original y las variantes de IFN- β -1a junto al estándar de rhIFN- β -1a, desde una actividad volumétrica de 20 UI/ml hasta 0,156 UI/ml. Luego, la placa se incubó durante 6 h a 37 °C.

Se eliminó el sobrenadante por inversión, se escurrió y se colocaron 100 μ l de una dilución apropiada del virus (VSV) en medio de ensayo, incubándose durante 18 h hasta observar el máximo efecto citolítico en aquellos pozos correspondientes a las células no tratadas con IFN.

Para revelar el ensayo, se eliminó el sobrenadante de cultivo por inversión, se escurrió y se adicionaron 50 μ l por pozo de una solución de cristal violeta (Anedra, Argentina) 1% (P/V)

preparada en metanol (Merck, Alemania) 40% (V/V). Se incubó durante 15 min a 37 °C. Esta etapa tiene por objetivo fijar y colorear aquellas células que no fueron lisadas por el virus y, por lo tanto, permanecieron adheridas al sustrato. 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 200 µl de ácido acético (Merck, Alemania) 20% (V/V). La lectura del color generado se efectuó a una $\lambda=540$ nm en un lector de placas de microtitulación que permite una homogenización de la placa previo a la lectura.

Se graficaron los datos de absorbancia en función de los valores correspondientes de actividad del rhIFN- β -1a (estándar) y de las diluciones de las muestras en escala logarítmica. Se calcularon los valores de actividad biológica para cada una de las nuevas moléculas mediante comparación con el estándar utilizando el método de comparación de rectas paralelas.

Finalmente, se determinó la actividad biológica específica (ABE) realizando el cociente entre la ABAV y la concentración de las variantes de IFN- β en las muestras correspondientes, obtenida por medición de absorbancia a $\lambda=280$ nm para las muestras purificadas (fórmula 6, sección 8.3.1).

En cada ensayo, el estándar de rhIFN- β -1a y las muestras se procesaron por triplicado, realizándose, además, dos tipos de controles:

- » Control de crecimiento, 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 µl de la dilución del IFN estándar o de las muestras y los 100 µl de la dilución del virus por 200 µl de medio de ensayo.
- » Control de lisis, en ausencia de IFN, para evaluar el efecto del virus sobre las células. Para ello, se adicionaron 100 µl de medio de ensayo en lugar de la dilución del IFN.

Se realizaron 8 experimentos independientes y los resultados fueron analizados mediante tests estadísticos apropiados. Finalmente, el valor de actividad biológica porcentual se determinó realizando el cociente entre las medias de las ABE de cada una de las variantes de inmunizadas y la media de las ABE del IFN- β -1a(WT).

9.2 Análisis espectroscópico por Dicroísmo Circular (DC) en UV cercano y lejano

9.2.1 Espectroscopia de DC en UV cercano y lejano

Las variantes de IFN- β -1a fueron analizadas en un espectropolarímetro UV-Vis marca JASCO modelo J-1500 (Jasco Inc., Easton, USA), utilizando una cubeta de cuarzo de paso óptico de 10

mm y un escáner a una velocidad de 20 nm/min y un tiempo de respuesta de 1 s. Se adquirieron espectros de dicroísmo circular entre 250 y 320 nm (UV cercano), correspondiente a la región de absorción de los aminoácidos aromáticos, ó entre 190 y 240 nm (UV lejano), correspondiente a la región de absorción de los enlaces que componen el plano peptídico. Las muestras se analizaron a temperatura ambiente, en a una concentración de 0,33 mg/ml.

Para comparación y análisis estadísticos de los espectros de DC aplicamos el método de distancias de Manhattan normalizada (NM) (116), utilizando la siguiente ecuación:

$$NM = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n [Ui / \sum Ui] - [Ri / \sum Ri] \quad (7)$$

Ui: Comparación de mediciones de espectro de muestra (i).

Ri: Medición del espectro de referencia (i).

n: Número de datos experimentales en el espectro

Este ensayo fue realizado por la Plataforma Argentina de Biología Estructural y Metabolómica (PLABEM) (predio CONICET - Rosario). El análisis espectroscópico por DC aplicando el método de distancias de Manhattan se llevó a cabo en colaboración con el Dr. Alberto Sergio Garay, en el Laboratorio de Modelado Molecular, perteneciente a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas – UNL.

10. EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD IN VIVO DE IFN- β -1 α Y SUS VARIANTES DE-INMUNIZADAS

Con el fin de evaluar el efecto de las mutaciones introducidas sobre la inmunogenicidad de IFN- β -1 α , se llevó a cabo un análisis experimental *in vivo*. Dicho estudio consistió en determinar la activación de linfocitos T en muestras de células esplénicas (CE) de ratones transgénicos incubadas en presencia de la proteína original o de sus variantes de-inmunizadas. El protocolo desarrollado se describe a continuación.

10.1 Plan de inmunización

Para el estudio de la respuesta inmune *in vivo*, se emplearon ratones transgénicos cuyo sistema de presentación antigénica endógeno (H2 de Clase I y II) se ha eliminado y reemplazado por los alelos que codifican para proteínas del CMH humano, específicamente HLA-A2 y HLA-DR3 (β 2m-/- H-2Db-/- IA β -/- IA α -/- IE β -/-). Se utilizaron ratones transgénicos HLA-DRB1*03:01

porque este alelo específico está fuertemente asociado con un alto riesgo de EM en humanos (117). Estos animales fueron desarrollados por Francois Lemonnier y gentilmente provistos por el Instituto Pasteur (París, Francia) a través de un Acuerdo de Transferencia de Materiales. La crianza y reproducción se realizó en el Centro de Medicina Comparada (CMC) perteneciente al Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICIVET-Litoral).

Los protocolos de inmunización consistieron en tres inoculaciones intraperitoneales con 25 µg de cada proteína: IFN-β-1a(WT) [rhIFN-β-1a (Gema Biotech, Argentina)] y dos variantes de-inmunizadas, espaciadas por intervalos de 14 días. Los ratones se dividieron en cuatro grupos conformados por siete animales cada uno, uno por cada proteína a evaluar más un grupo control. En la primera dosis, cada ratón se inoculó con 350 µl de una emulsión preparada al mezclar 175 µl de solución de la proteína diluida en PBS (o sólo PBS para el grupo control) con 175 µl de adyuvante completo de Freund (Sigma, EE. UU.). La segunda inoculación se realizó en idénticas condiciones, pero empleando el adyuvante incompleto de Freund (Sigma, EE. UU.). La tercera y última inoculación se realizó bajo las mismas condiciones que la segunda dosis.

Luego de transcurridos 7 días desde la última inoculación, se realizaron extracciones de sangre periférica empleando heparina sódica como agente anticoagulante (Fada Pharma, Argentina) y se sacrificaron todos los animales. A partir de las muestras de sangre se separó el plasma por centrifugación a 5000 rpm durante 5 min y se conservó a -70 °C, para su posterior evaluación en ensayos de ELISA indirecto (sección 10.7).

Además, con el objetivo de obtener CE para ensayos de estimulación antigénica *ex vivo*, se realizó la extracción del bazo y los ganglios linfáticos de cada ratón.

10.2 Aislamiento de células esplénicas

Para llevar a cabo este procedimiento, el bazo y los ganglios linfáticos de cada ratón fueron disgregados conjuntamente en placas de Petri conteniendo 6 ml de PBS. La purificación de las CE presentes en estas suspensiones celulares se realizó empleando la técnica de aislamiento en gradiente de Fycoll-Hypaque (118). Este protocolo consistió en trasvasar la muestra de las diferentes suspensiones celulares en tubos cónicos de 15 ml que previamente contenían 2 ml de Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Suecia) frío, y centrifugar durante 30 min a 400 x g. La capa de CE se colectó en tubos cónicos de 15 ml y se lavó 2 veces con 8 ml de PBS. Finalmente, las CE se resuspendieron en medio RPMI suplementado y se incubaron por 24 h en estufa gaseada (Nuair, EE. UU.) a 37 °C, atmósfera de CO₂ al 5% y saturada de humedad.

Transcurrido ese tiempo, se realizaron recuentos celulares (sección 6.2) y se procedió al tratamiento *ex vivo* de las mismas con la proteína de interés.

10.3 Análisis de la respuesta inmune ex vivo de las células esplénicas incubadas con IFN- β -1a y sus variantes de-inmunizadas

Las CE se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de 600.000 cél/pozo, utilizando 12 pocillos por cada ratón, [para evaluar cuatro condiciones diferentes por triplicado: control de medio (negativo), control positivo, control de excipientes, antígeno]. La estimulación antigénica se realizó con 5 μ g de cada proteína (IFN- β -1a(WT) y dos variantes de-inmunizadas) por pocillo. El control negativo consistió en el agregado de igual volumen de PBS que el de solución de proteína. El control positivo se realizó empleando lectinas de *Phaseolus vulgaris* (Sigma, EE.UU.) como agente mitógeno inespecífico, a una concentración de 1 μ g/ml. Todas las condiciones de tratamiento fueron realizadas en un volumen final de 120 μ l y cultivadas durante 72 h hasta su cosecha y posterior análisis. Los sobrenadantes de cultivo se evaluaron por medio de un ensayo de ELISA sándwich para la cuantificación de IFN- γ e IL-4 de ratón (mIFN- γ y mL-4, respectivamente), según las metodologías descritas en las secciones 10.4 y 10.5 de este apartado.

10.4 Cuantificación de mIFN- γ en sobrenadantes de cultivo de células esplénicas mediante ELISA sándwich

El ensayo de ELISA sándwich para la detección de mIFN- γ se basa en la captura de esta citoquina por parte del mAb anti-IFN- γ de ratón (mAb $\bar{\alpha}$ -mIFN- γ , BD Pharmigen, EE. UU.) inmovilizado sobre placas de poliestireno. Luego se realiza una incubación con la muestra y finalmente la citoquina es detectada por medio de un mAb anti-IFN- γ de ratón biotinilado (biotin-mAb $\bar{\alpha}$ -mIFN- γ , Sigma, EE. UU.), el cual es reconocido por un conjugado estreptavidina-peroxidasa. El revelado de la reacción se realiza agregando el sustrato de la enzima junto con un cromógeno.

Las etapas del protocolo se describen a continuación:

Sensibilización: se sensibilizaron placas de poliestireno de fondo plano de 96 pozos (Greiner, Austria) con 100 μ l por pozo de una solución de 1 μ g/ml del mAb $\bar{\alpha}$ -mIFN- γ (BD Pharmigen, EE.UU.) en solución de sensibilización [solución de Na₂CO₃/NaHCO₃ 50 mM pH 9,6]. Se incubó durante 1 h a 37 °C y luego toda la noche a 4 °C.

Bloqueo: el bloqueo de los sitios de interacción inespecífica se realizó con 200 µl por pozo de solución de bloqueo [solución de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma, EE.UU.) 1% (P/V) en PBS]. Se incubó durante 1 h a 37 °C.

Primera incubación: en cada pozo se añadieron 100 µl de diluciones sucesivas 1:2 del estándar de rmlFN-γ (BD, EE.UU.), desde 20 ng/ml hasta 0,098 ng/ml, en solución diluyente [solución de BSA 0,1% (P/V) en PBS con el agregado de Tween 20 al 0,05% (V/V)]. Los sobrenadantes de cultivo de los ensayos de linfo-activación correspondientes a los controles (control negativo, de excipiente y control positivo) se sembraron puros y por triplicado. Mientras que, los sobrenadantes de cultivo correspondientes a la estimulación con la proteína (IFN-β-1a(WT) y dos variantes de-inmunizadas) se sembraron por triplicado: puros, con una dilución 1:5 y con una dilución 1:10. Se incubó la placa durante 2 h a temperatura ambiente, en agitación.

Segunda incubación: en cada pozo se agregaron 100 µl de una solución de mAb biotinilado α-mIFN-γ MM700B (Invitrogen, EE.UU.) en una dilución 1:1660 en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37°C.

Tercera incubación: se agregaron 100 µl por pozo de una solución del conjugado streptavidina-peroxidasa: Amdex (Sigma, EE.UU.) en una dilución 1:5000 en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37°C.

Reacción reveladora: se repitió el procedimiento indicado en la sección 7.1 de este mismo apartado.

Cuantificación: se graficaron los valores de absorbancia en función de las concentraciones de rmlFN-γ empleado como estándar, en escala logarítmica. La concentración de las muestras se determinó interpolando los valores de absorbancia en la zona lineal de la curva estándar.

Todas las incubaciones se llevaron a cabo en cámara húmeda. Después de cada etapa se realizaron cinco lavados con solución de lavado [solución de PBS con el agregado de Tween 20 (Bio Basic, Canadá) al 0,05% V/V].

10.5 Cuantificación de mIL-4 en sobrenadantes de cultivo de células esplénicas mediante ELISA sándwich

El ensayo de ELISA sándwich para la detección de mIL-4 se basa en la captura de esta citoquina por parte del mAb anti-IL-4 de ratón (mAb α-mIL-4, Invitrogen, EE. UU.) inmovilizado sobre placas de poliestireno. Luego se realiza una incubación con la muestra y finalmente la citoquina es detectada por medio de un mAb anti-IL-4 de ratón biotinilado (biotin-mAb α-mIL-4,

Invitrogen, EE. UU.) el cual es reconocido por un conjugado estreptavidina-peroxidasa. El revelado de la reacción se realiza agregando el sustrato de la enzima junto con un cromógeno.

Las etapas del protocolo se describen a continuación:

Sensibilización: se sensibilizaron placas de poliestireno de fondo plano de 96 pozos (Greiner, Austria) con 100 µl por pozo de una solución de 1 ng/ul del mAb α -hIL-4 AN-18 (Invitrogen, EE. UU.) en solución de sensibilización [solución de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 50 mM pH 9,6]. Se incubó durante 1 h a 37°C y luego toda la noche a 4°C.

Bloqueo: el bloqueo de los sitios de interacción inespecífica se realizó con 200 µl por pozo de solución de bloqueo [solución de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma, EE.UU.) 1% P/V en PBS]. Se incubó durante 1 h a 37°C.

Primera incubación: en cada pozo se añadieron 100 µl de diluciones sucesivas 1:2 del estándar de rmlL-4 (Abcam, Reino Unido), desde 10 ng/ml hasta 0,078 ng/ml, en solución diluyente [solución de BSA 0,1% P/V en PBS con el agregado de Tween 20 al 0,05% V/V]. Todos los sobrenadantes de cultivo de los ensayos de linfo-activación se sembraron puros por triplicado (controles y estimulados con las proteínas IFN- β -1a(WT) y dos variantes de inmunizadas). Se incubó durante 1 h a 37°C.

Segunda incubación: en cada pozo se agregaron 100 µl de una solución de mAb biotinilado α -mIL-4 (Invitrogen, EE.UU.) en una dilución 1:3300 en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37 °C.

Tercera incubación: se agregaron 100 µl por pozo de una solución del conjugado streptavidina-peroxidasa (Amdex, Sigma, EE.UU.) en una dilución 1:5.000 en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37°C.

Reacción reveladora: se repitió el procedimiento indicado en la sección 7.1 del presente apartado.

Cuantificación: se graficaron los valores de absorbancia en función de las concentraciones de rmlL-4 empleado como estándar, en escala logarítmica.

Todas las incubaciones se llevaron a cabo en cámara húmeda. Después de cada etapa se realizaron cinco lavados con solución de lavado [solución de PBS con el agregado de Tween 20 (Bio Basic, Canadá) al 0,05% (V/V)].

10.6 Índice de Estimulación

La magnitud de la activación de los linfocitos T en cada muestra de CE frente a las distintas variantes del IFN- β -1a, se estableció como un índice de estimulación (IE). El IE se define

como el cociente entre la concentración de la citoquina en la muestra y el valor correspondiente al control de excipientes.

Se realizó un análisis estadístico de los resultados obtenidos para analizar la existencia de diferencias significativas entre IFN- β -1a-(WT) y dos variantes de-inmunizadas.

10.7 Cuantificación de anticuerpos totales α -IFN- β -a1 en plasma de ratones inmunizados con las distintas variantes de IFN- β -a1 mediante ELISA indirecto

La técnica de ELISA indirecto para evaluar la producción de anticuerpos contra las variantes analizadas se basó en la sensibilización de las placas de microtitulación con la proteína de interés (IFN- β -1-(WT) y dos variantes de-inmunizadas), seguida de la incubación con las muestras de plasma de ratón y posterior detección de anticuerpos unidos mediante un pAb anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa.

Las etapas del protocolo desarrollado fueron las siguientes:

Sensibilización: se sensibilizaron placas de poliestireno de fondo plano de 96 pozos (Greiner, Austria) con 100 μ l por pozo de una solución de 1 μ g/ml de la proteína utilizada para la inoculación de los ratones (IFN- β -1a-(WT) y dos variantes de-inmunizadas) en solución de sensibilización [solución de Na₂CO₃/NaHCO₃ 50 mM pH 9,6]. Se incubó durante 1 h a 37 °C y luego durante la noche a 4 °C.

Bloqueo: el bloqueo de los sitios de interacción inespecífica se realizó con 200 μ l por pozo de solución de bloqueo [solución de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma, EE. UU.) 1% (P/V) en PBS]. Se incubó durante 1 h a 37 °C.

Primera incubación: en cada pozo se añadieron 100 μ l de diluciones sucesivas 1:2 de las muestras de plasma de ratón diluidas entre 1:50 y 1:1000, dependiendo de cada animal, en solución diluyente [solución de BSA 0,1% (P/V) en PBS con el agregado de Tween 20 al 0,05% (V/V)]. Se realizó un control negativo para evaluar la posible unión inespecífica de los reactivos, sembrando 100 μ l de solución diluyente, por triplicado. Se incubó durante 1 h a 37 °C.

Segunda incubación: en cada pozo se agregaron 100 μ l de una solución de pAb α -IgG de ratón conjugado a peroxidasa P0260 (Aglient, DAKO, EE.UU.) en una dilución 1:2000 en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37 °C.

Reacción reveladora: se repitió el procedimiento indicado en la sección 7.1.

Todas las incubaciones se llevaron a cabo en cámara húmeda. Después de cada etapa se realizaron cinco lavados con solución de lavado [solución de PBS con el agregado de Tween 20 (Bio Basic, Canadá) al 0,05% (V/V)].

Cuantificación: se graficaron los valores de absorbancia en función de las diluciones del plasma en escala logarítmica y se realizó un ajuste de los puntos obtenidos (curva sigmoideal). La primera dilución del plasma que presentó una absorbancia por encima del valor de *cut off* (definido como el promedio del valor del control negativo más tres desviaciones estándar) fue considerada como el título de la muestra. Los datos fueron analizados mediante el método de análisis estadístico apropiado.

10.8 Evaluación del título de anticuerpos neutralizantes contra las distintas variantes de IFN- β -1a en plasma de ratones por medio de ensayos de inhibición de la ABAV

Con el objetivo de determinar el título de anticuerpos capaces de neutralizar la ABAV *in vitro* del IFN en el plasma de ratones inmunizados con las distintas variantes de IFN- β -1a, se realizaron ensayos de inhibición de la actividad antiviral protectora.

Se llevaron a cabo ensayos de valoración biológica antiviral (sección 9.1.1) realizando una pre-incubación (con diluciones seriadas 1:2) del plasma de ratón con una concentración constante de la variante de IFN- β -1a correspondiente. De esta manera, aquellos anticuerpos capaces de reconocer y unir al IFN en su sitio activo reducirán la capacidad protectora de la citoquina. Dicha reducción será más evidente en aquellos pocillos en los que el IFN se haya incubado con el plasma más concentrado, observándose mayor lisis celular. En contraste, aquellos pocillos pre-incubados con diluciones mayores de plasma presentarán mayor efector protector y por ende mayor viabilidad celular.

En una placa de cultivo estéril de 96 pozos se realizaron diluciones seriadas 1:2 de las muestras de plasma de ratón, partiendo de diluciones iniciales 1:25, con volumen final de 50 μ l. Luego se agregaron 50 μ l de la solución de proteína (IFN- β -1a-(WT) y dos variantes de inmunizadas) con una actividad volumétrica de 40 UI/ml. Todas las diluciones se realizaron en medio de ensayo (medio MEM suplementado con SFB 2% (V/V)). La placa se incubó durante 24 h a 37 °C y luego las mezclas plasma-IFN pre-incubadas se transfirieron (100 μ l/pozo) a placas de cultivo con células WISH sembradas. Además, se realizaron un control de lisis (células no tratadas con IFN), un control de crecimiento (células no tratadas con IFN ni con virus) y una curva control sembrando cada variante de IFN- β -1a sin pre-incubar, desde una actividad volumétrica de 20 UI/ml hasta 0,156 UI/ml. Luego, la placa se incubó durante 6 h a 37 °C.

Posteriormente se procedió con el ensayo de ABAV según se detalló previamente en el apartado 9.1.1.

Se graficaron los datos de absorbancia en función de las diluciones del plasma en escala logarítmica y se calculó el título correspondiente como la inversa del valor de la dilución necesaria para producir una inhibición del 50% de la actividad protectora del IFN.

A los resultados obtenidos, se les realizó un análisis estadístico apropiado con el fin de determinar la existencia de diferencias significativas entre las muestras.

11. EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD EX VIVO DE IFN- β -1a Y SUS VARIANTES DE-INMUNIZADAS

Con el fin de evaluar el efecto de las mutaciones introducidas sobre la inmunogenicidad de IFN- β -1a, se llevó a cabo un análisis experimental *ex vivo*. Dicho estudio consistió en analizar la respuesta inmune celular en muestras de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de pacientes con esclerosis múltiple, tratadas con la proteína original o sus variantes de-inmunizadas. El protocolo desarrollado se describe a continuación.

11.1 Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humana

El aislamiento de CMSP se realizó a partir de muestras de sangre extraídas de donantes voluntarios, y fueron tratadas con citrato de sodio como agente anti-coagulante. Para ello se aplicó el método que emplea Ficoll-Hypaque (118) ya que resulta muy conveniente desde el punto de vista de la pureza alcanzada y del costo por muestra.

Para obtener las CMSP, una vez extraída la muestra de sangre anticoagulada se trasvasó a tubos cónicos de 50 ml y se centrifugó a temperatura ambiente durante 20 min a 200 x *g*, sin freno. Luego, se lavó 2 veces con solución fisiológica (relación 1:1) y se volvió a centrifugar de la misma manera. La interfase entre el plasma rico en plaquetas (PRP) y los eritrocitos y granulocitos fue colectada en tubos cónicos de 50 ml y llevada a un volumen final de 35 ml con solución fisiológica. Esta muestra (enriquecida en células mononucleares) fue sembrada sobre 15 ml de Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Suecia) frío y centrifugada durante 35 min a 400 x *g*. La capa de células mononucleares se colectó en tubos cónicos de 15 ml y se lavó 2 veces con solución fisiológica. Finalmente, las CMSP se resuspendieron en solución fisiológica para proceder a su recuento y posterior criopreservación, siguiendo la metodología aplicada para las líneas celulares animales (sección 6.3). Los criotubos, conteniendo las suspensiones celulares ($1,5 \cdot 10^7$ - $3 \cdot 10^7$ CMSP/ml) fueron almacenados en N₂ líquido.

11.2 Análisis de la respuesta inmune celular en muestras de células mononucleares de sangre periférica humana (CMSP)

11.2.1 Ensayo de estimulación antigénica

En primer lugar, $2,5 \cdot 10^6$ cél/ml de CMSP de dos donantes voluntarios fueron incubadas en medio RPMI completo, en placas de cultivo celular de 12 pocillos de fondo plano, en presencia de 20ug/ml de IFN- β -1a-(WT). Además, se incluyeron agentes activadores de los linfocitos T como controles positivos: enterotoxina B de *Staphylococcus* (SEB), toxina tetánica (TT) y un pool de péptidos de la glicoproteína Mielina Oligodendrocito (MOG) (en todos los casos a una concentración de 1 μ g/mL, Sigma, EE.UU.). Estas incubaciones se realizaron en presencia de un anticuerpo de bloqueo de CD40, mAb anti-CD40 a una concentración final de 1 ug/ml (Miltenyi Biotec, EE.UU.). Las incubaciones se realizaron a 37 °C - 5% de CO₂ durante 5 h.

11.2.2 Detección de marcadores celulares vinculados con la activación de linfocitos T mediante citometría de flujo

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las células fueron cosechadas mediante centrifugación a 400 x g durante 5 min a temperatura ambiente, y resuspendidas en medio de cultivo RPMI completo suplementado con CaCl₂ (1,5 mM) y beta-mercaptoetanol (55 μ M) en presencia de distintos anticuerpos conjugados a fluorocromos específicos. Transcurridos 20 min de incubación en oscuridad, las células fueron nuevamente centrifugadas en las mismas condiciones y resuspendidas en el mismo medio de cultivo para proceder al análisis por citometría de flujo. Las células fueron analizadas y clasificadas en un separador BD FACSAria III (11 colores, BD FACS Diva Software V7.0, BD Biosciences). Todos los conjugados se titularon para determinar su dilución óptima y volumen de tinción. En la Tabla 1 se describen los anticuerpos utilizados para cada marcador.

Tabla 1. Anticuerpos conjugados a fluorocromos específicos utilizados en los ensayos de citometría de flujo.

Antígeno	Fluorocromo/Canal	Clon	Marca
HLA-DR	FITC	L243	BD Biosciences
CD3	V700	UCHT1	Biolegend
CD4	BB700	SK3	Miltenyi Biotec
CD8	BV510	SK1	Biolegend
CD25	BV421	M-A251	Biolegend
CD69	BV177	FN50	Biolegend
CD137	APC	4B4-1	Biolegend
CD154	PE	5C8	Miltenyi Biotec
CD45RA	PE-Dazzle 954	HI100	Biolegend
CCR7	Pe-Cy7	ND	Biolegend

11.2.3 Ensayos de re-estimulación

Los linfocitos T de memoria activados en cada muestra fueron aislados por medio de *cell sorting* y re-estimulados con las proteínas de interés.

Los clones de células T CD4⁺CD154⁺ específicas para antígenos se clasificaron individualmente y se cultivaron para su expansión en medio RPMI completo suplementado con aminoácidos no esenciales (NEAA, 1x, Sigma) y ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico (HEPES, 10mM, Sigma)) en presencia de una *feeder layer* constituida por CMSP e IL-2 (200 U/ml, Miltenyi Biotec) en placas de cultivo de 96 pocillos. Cuando alcanzaron una densidad celular suficiente para cubrir el fondo de la placa, las mismas se cosecharon y transfirieron a una placa de 48 pocillos, previamente tratada con anticuerpos anti-CD3 (OKT3) (Miltenyi Biotec.) con medio fresco. Nuevamente, cuando las células alcanzaron la confluencia, $2,5 \cdot 10^6$ células fueron centrifugadas a $300 \times g$ durante 6 min a 4°C, y transferidas a una placa de cultivo de 12 pocillos con medio fresco por 48/72 h.

Para realizar el ensayo de re-estimulación antigénica, 24 h previas, se descongelaron CMSP de los donantes voluntarios a evaluar para obtener las CPA necesarias para la ejecución

del ensayo. Brevemente, se descongelaron las CMSP, se lavaron y sembraron a una densidad aproximada de $10 \cdot 10^7$ cél/ml en placas de 12 pocillos. Luego de 24 h las células fueron cosechadas y centrifugadas a $300 \times g$ durante 10 min a temperatura ambiente, y $1 \cdot 10^7$ células fueron resuspendidas en medio RPMI completo e incubadas con perlas magnéticas conjugadas con un anticuerpo anti-CD3 (hCD3 MicroBeads, Miltenyi Biotech). La mezcla se incubó a 4°C por 15 min y luego se separaron las perlas (unidas a las células T) de la suspensión celular por medio de columnas especialmente diseñadas para tal fin (columnas LD, Miltenyi Biotech). Las células ricas en CPAs fueron cultivadas en medio RPMI completo para su posterior uso.

Finalmente, para la re-estimulación antigénica, se cultivaron $1 \cdot 10^6$ células T $\text{CD4}^+\text{CD154}^+$, con la misma cantidad de CPA y se siguieron los protocolos mencionados en los apartados 11.2.1 y 11.2.2. En esta instancia, las células fueron estimuladas con IFN- β -1a-(WT) y con las variantes de-inmunizadas en estudio, y se analizaron los marcadores celulares de activación de linfocitos T: CD69, CD137, CD154.

En una segunda instancia se amplió la cohorte analizada (5 donantes) y se llevaron a cabo las estimulaciones iniciales con las tres proteínas en estudio. Finalmente, para confirmar los resultados obtenidos, se aislaron y re-estimularon los linfocitos T específicos de memoria activados por las tres proteínas en estudio.

Resultados

1. DESARROLLO DE VARIANTES DE-INMUNIZADAS DE IFN- β -1a MEDIANTE ALGORITMOS DE PREDICCIÓN IN SILICO

La de-inmunización de proteínas terapéuticas consiste en la identificación y modificación de residuos específicos que disminuyan la afinidad de unión al CMH-II de los epitopes reconocidos por células T, con el menor impacto posible en la estructura proteica y la función biológica.

Con el objetivo de estudiar la inmunogenicidad potencial de IFN- β -1a, se realizó un análisis minucioso de su secuencia de aminoácidos, empleando el conjunto de herramientas inmunoinformáticas *EpiMatrix* (62).

Esta etapa consistió en la predicción de la inmunogenicidad global de la proteína IFN- β -1a “original o *wilde type*” (IFN- β -1a(WT)) por medio de algoritmos capaces de asignar un “score” de inmunogenicidad generado a partir del contenido de epitopes que son potencialmente capaces de desencadenar una respuesta inmune T-dependiente. Este análisis inmunoinformático se realizó empleando el conjunto de herramientas ISPRI (*Interactive Screening and Protein Reengineering Interface*) provisto por la compañía *EpiVax*. En la Figura 9 se muestra la elevada inmunogenicidad potencial (*Score Z*= 101,81) para el IFN- β -1a(WT). En la misma escala de inmunogenicidad se encuentran, además, algunos péptidos y proteínas como referencia, desde aquellos que presentan mayor inmunogenicidad (rojo) hasta los de menor inmunogenicidad (verde). Este resultado es consistente con datos clínicos previamente reportados que ponen de manifiesto la elevada inmunogenicidad del IFN- β -1a (119-123). A su vez, por medio de la utilización de los algoritmos *EpiMatrix* y *ClustiMer* se identificaron cuatro clústeres, es decir regiones que presentan gran contenido de epitopes con elevada probabilidad de unión a las moléculas del HLA. Los clústeres de IFN- β -1a(WT) abarcan los residuos aminoacídicos: 5–32, 57–80, 108–132, 145–158; dos de los cuales se solapan con secuencias de epitopes inmunodominantes reconocidos por células T reportadas previamente en la bibliografía (124).

Asimismo, mediante la herramienta *Optimatix* se identificaron aquellos aminoácidos más relevantes en la inmunogenicidad de cada péptido, y se realizaron reemplazos iterativos por residuos que permitan reducir su potencial inmunogénico y al mismo tiempo no produzcan una disrupción en la estructura y/o función de la proteína en su conjunto, conocimiento procedente de la bibliografía en relación a la identificación de aquellos residuos críticos para la

estructura y actividad biológica del IFN- β -1a(WT) (88). Además, se evitó mutar aquellos residuos que naturalmente se hallaban altamente conservados (funcional/estructuralmente importantes), para lo cual se realizó un alineamiento múltiple de secuencias homólogas al IFN- β -1a, seleccionadas de la base de datos no redundante (nr) del NCBI empleando el algoritmo de MAFFT (resultado no mostrado).

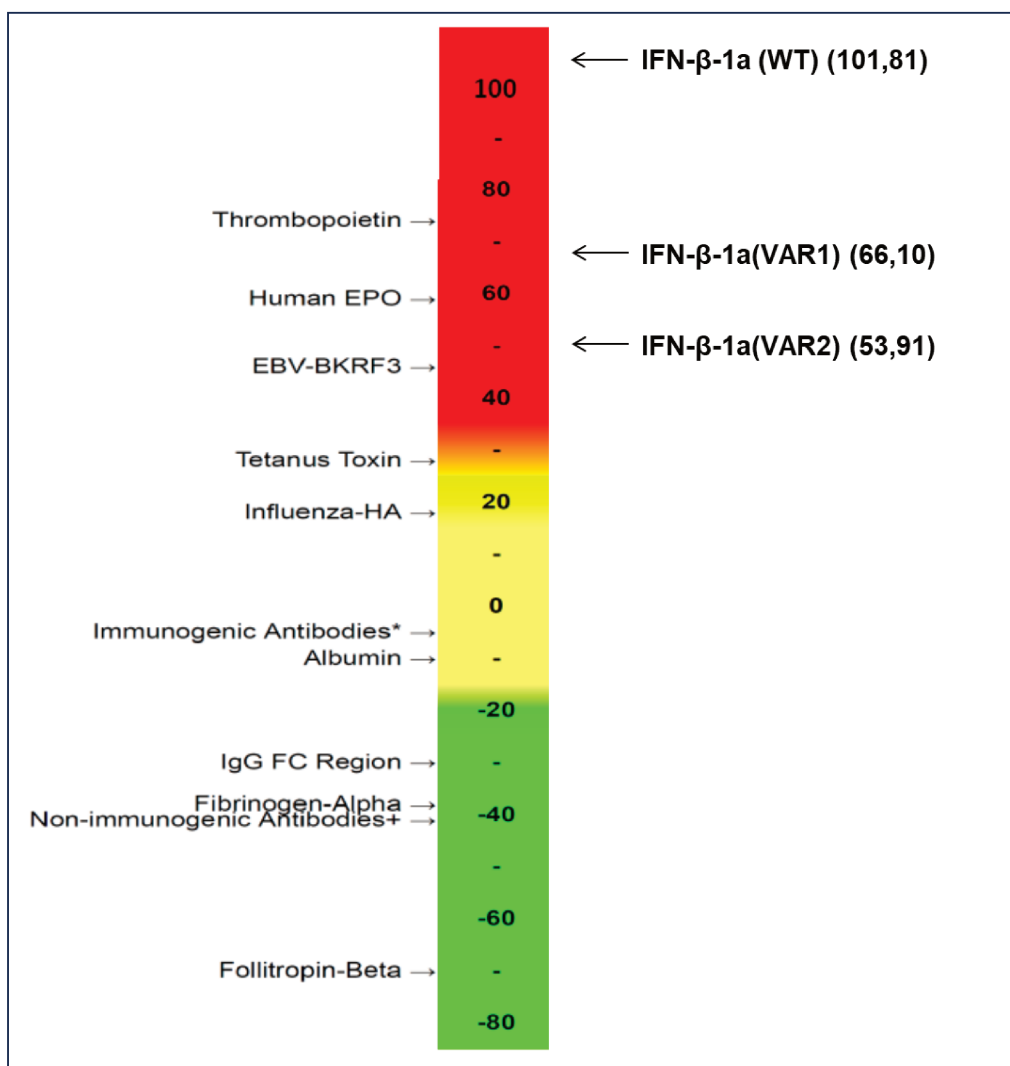


Fig. 9: Scores de inmunogenicidad de IFN- β -1a, suministrados por las herramientas de EpiVax Inc. EpiMatrix Protein Immunogenicity Report. Localización de IFN-b-1a(WT) (A) y sus variantes de-inmunizadas (B) en la escala de inmunogenicidad potencial, en función de sus scores globales de inmunogenicidad. Estos valores representan la desviación en el contenido potencial de epitopes con respecto a un valor de referencia, basado en un conjunto aleatorio de péptidos estándar. Aquellas proteínas con score superior a 10 son considerados como potencialmente inmunogénicas.

A partir de la información colectada del análisis descripto, en combinación con el estudio de estabilidad realizado mediante el paquete Bioinformático Rosetta5, fue posible diseñar las diferentes versiones de-inmunizadas de IFN- β -1a. Dichas variantes se construyeron a partir de

la introducción de hasta ocho mutaciones en su secuencia: N25P; L28P; Y60H; N65H; S74L; F111L; M117T; N158E. Estas modificaciones fueron introducidas para generar dos variantes de la proteína: IFN- β -1a(VAR1) que contiene las cuatro mutaciones con mayor impacto en la inmunogenicidad: N25P; Y60H; M117T; N158E; e IFN- β -1a(VAR2) que contiene las ocho mutaciones antes mencionadas.

En la Tabla 2 se describe el impacto que genera cada una de las mutaciones en la inmunogenicidad potencial de la proteína.

Tabla 2. Mutaciones introducidas en la secuencia aminoacídica del IFN- β -1a para generar las diferentes versiones de-inmunizadas y su contribución al *score* de inmunogenicidad.

Mutación	Cambio en el <i>score</i> de Inmunogenicidad
N25P	8.25
L28P	5.48
Y60H	6.23
N65H	3.14
S74L	1.03
F111L	1.91
M117T	6.16
N158E	15.06

Una vez diseñadas las muteínas, se realizó un análisis *in silico* de la inmunogenicidad global de las variantes de-inmunizadas de IFN- β -1a(WT). En la Figura 9 se representan los valores de *score* predichos por *EpiMatrix* para cada una de las proteínas, en una escala de inmunogenicidad en la que se ubican además algunos péptidos y proteínas como referencia. Se puede observar en dicha figura una marcada reducción en los *scores* correspondientes a las variantes de-inmunizadas, en comparación al valor asignado a la proteína original.

Posteriormente, se analizó la estabilidad de cada variante a partir del cálculo de la $\Delta\Delta G$, la cual se determinó empleando el software *dg_monomer4*, incluido en el paquete bioinformático *Rosetta5*. En particular, los resultados de $\Delta\Delta G$ para las variantes fueron $\Delta\Delta G$ IFN- β -1a(VAR1) = 18.569 y $\Delta\Delta G$ IFN- β -1a(VAR2) = 3.044. Sorprendentemente, IFN- β -1a(VAR2) que contiene el mayor número de mutaciones (n=8) resultó ser la menos afectada en términos de estabilidad.

En la Figura 10 se pueden observar las estructuras moleculares para el IFN- β -1a(WT) y sus variantes de-inmunizadas, representando su esqueleto peptídico con cintas y mostrando los residuos considerados para la mutación con esferas de *Van der Waals*. Todos los residuos considerados para mutar están etiquetados en un código de una única letra para facilitar la comparación entre las estructuras.

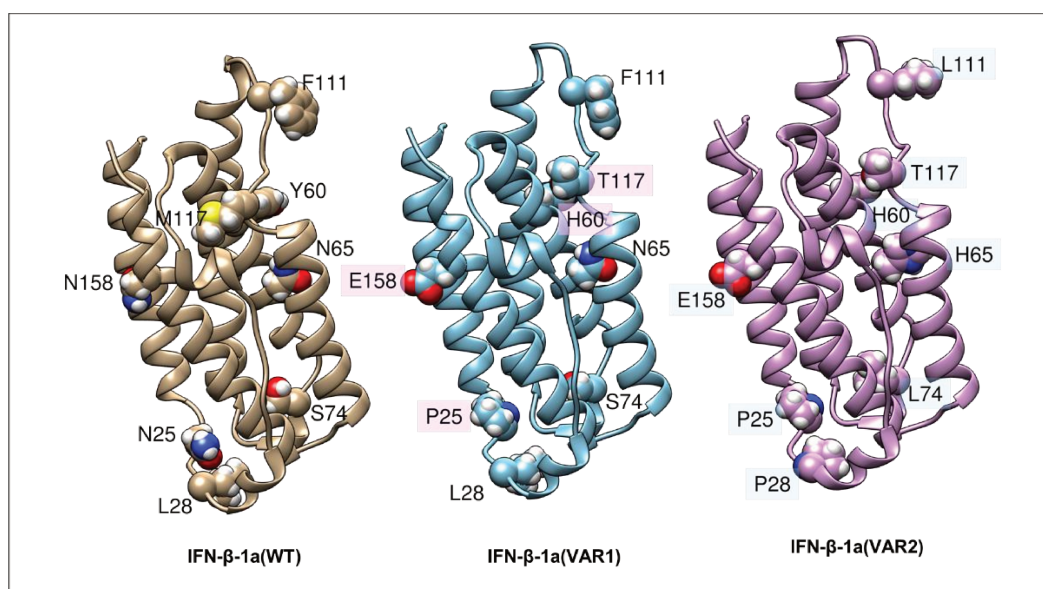


Fig. 10: Estructuras moleculares del IFN- β -1a original (IFN- β -1a(WT)) y de sus variantes de-inmunizadas, IFN- β -1a(VAR1) e IFN- β -1a(VAR2).

2. GENERACIÓN DE LAS VARIANTES DE-INMUNIZADAS DE IFN- β -1a

2.1 Construcción de los plásmidos pLV-PLK conteniendo las diferentes variantes de IFN- β -1a

Para realizar el clonado molecular de IFN- β -1a(VAR1) e IFN- β -1a(VAR2) sus secuencias codificantes se sintetizaron químicamente y adquirieron dentro del plásmido pUC57-Kan. El clonado se llevó a cabo en vectores de transferencia de sistemas lentivirales de tercera generación (pLV-PLK). Para ello, se realizaron mini-preparaciones del ADN plasmídico de los vectores adquiridos, y luego digestiones con las enzimas de restricción *Xba*I y *Sal*I, incorporadas previamente en la secuencia de cada variante, y presentes en el vector de transferencia. Dichas digestiones liberaron fragmentos de ADN de 590 pb, correspondientes a cada gen de interés (Figura 11A). El producto de la digestión se purificó e insertó dentro del plásmido pLV-pLK previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. La reacción de ligación fue

catalizada por la enzima T4 ADN ligasa y se transformaron bacterias *E. coli* (cepa TOP10) competentes. Se incluyeron, además, los controles correspondientes.

Las bacterias transformadas fueron sembradas en placas conteniendo medio LB-agar suplementado con ampicilina, a fin de seleccionar sólo aquellas bacterias que incorporaron el plásmido. Se seleccionaron clones al azar de cada placa de transformación y se determinó la presencia del transgén mediante reacciones en cadena de la polimerasa (PCR). Luego, con el fin de confirmar la presencia del transgén de interés, se realizó la mini-preparación de ADN plasmídico a partir de aquellos clones que resultaron positivos en el análisis anterior. Los ADN fueron digeridos con las enzimas *EcoRI/SalI* y sometidos a una corrida electroforética en gel de agarosa (Figura 11B). En esta instancia, se empleó la enzima *EcoRI*, ya que sólo está presente en el vector de transferencia en un único sitio, lo que confirma la correcta inserción del transgén. Además, la obtención de un fragmento de mayor tamaño molecular facilita su visualización. Posteriormente, la identidad de cada variante se determinó mediante reacciones de secuenciación (resultado no mostrado).

Estos clones bacterianos fueron criopreservados y se escogió uno de cada construcción con el fin de realizar maxi-preparaciones de ADN plasmídico para su posterior empleo en la generación de líneas celulares productoras de las proteínas de interés.

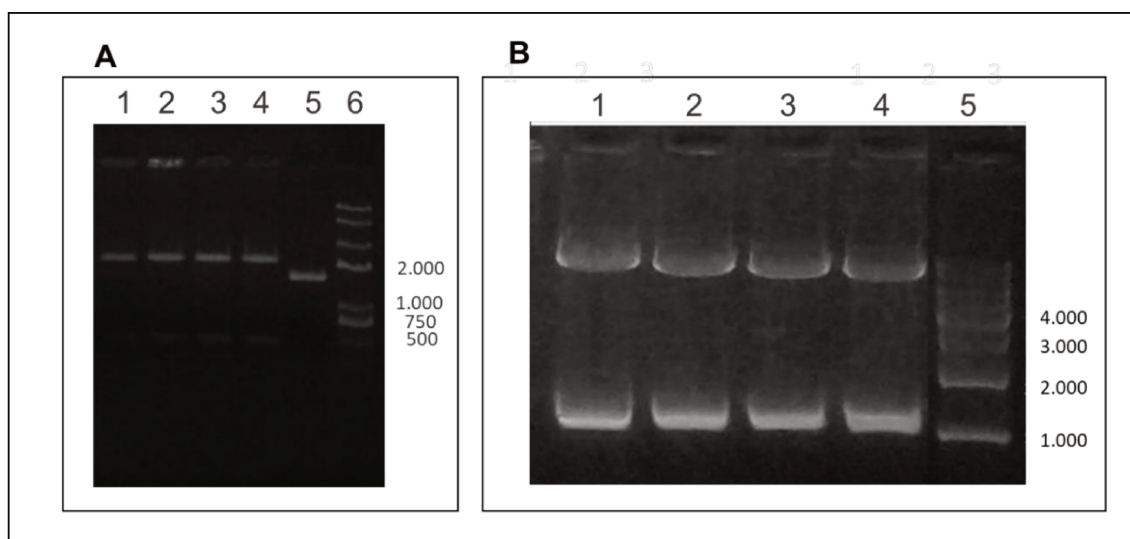


Fig. 11: Electroforesis en gel de agarosa al 1% (P/V) de las digestiones realizadas: A- Digestión *XbaI/SalI* de los vectores pUC57-Kan (VAR1 y VAR2). Referencias: **1 y 2:** pUC57-IFN-β-1a-VAR1 digerido; **3 y 4:** pUC57-IFN-β-1a-VAR2 digerido; **5:** pUC57-IFN-β-1a-VAR1 control no digerido; **6:** Marcador de tamaño molecular *Trans2K*® Plus DNA Marker. B- Digestión *EcoRI/SalI* de los vectores pLV-pLK (VAR 1 y VAR2). Referencias: **1 y 2:** pLV-pLK-IFN-β-1a-VAR1 digerido; **3 y 4:** pLV-pLK-IFN-β-1a-VAR2 digerido; **5:** Marcador de tamaño molecular *Trans5K*® Plus DNA Marker.

2.2 Generación de líneas celulares productoras de las variantes de-inmunizadas de IFN- β -1a

Los biofármacos presentan una elevada complejidad, por lo que en numerosos casos no pueden ser producidos en sistemas procariotas o eucariotas simples, como hongos o levaduras. Este es el caso de las proteínas glicosiladas similares a las humanas, que requieren de una maquinaria metabólica pos/co-traducciona sólo presente en células animales. Asimismo, es necesaria la generación de líneas celulares estables que constituyan una fuente permanente e ilimitada de la proteína de interés. Esto puede llevarse a cabo empleando partículas lentivirales, las cuales actúan como vectores de transferencia del material genético al genoma celular.

Con el objetivo de obtener líneas celulares estables productoras de las variantes de IFN- β -1a, en una primera instancia, se ensamblaron partículas lentivirales en células HEK 293T/17, mediante transfección mediada por lípidos catiónicos. Para ello, se transfectaron las mismas con cuatro plásmidos: pRSR-Rev, expresado durante el empaquetamiento para inducir la exportación nuclear del vector de transferencia; pMD2G, que codifica la proteína G de la envoltura del virus VSV, necesaria para la entrada de la partícula viral a la célula; pMDLg/pRRE, que codifica las proteínas necesarias para el empaquetamiento del vector e integración en el genoma; y los plásmidos de transferencia pLV-pLK, que contienen las secuencias que codifican las proteínas de interés IFN- β -1a-(VAR1) e IFN- β -1a-(VAR2) y que además confieren a las células transducidas resistencia al antibiótico puromicina. Al cabo de 48 h, se cosecharon los sobrenadantes de cultivo conteniendo las partículas lentivirales y se utilizaron para transducir células CHO-K1. Con el fin de enriquecer el cultivo con aquellas células que presentan una mayor expresión de las proteínas de interés, las líneas fueron sometidas a un proceso de presión selectiva con concentraciones crecientes de antibiótico. Se comenzó a presionar el cultivo con una concentración de 10 μ g/ml de puromicina y se aumentó de manera gradual la concentración del agente de selección hasta observar la muerte de todas las células o una disminución de la productividad de las moléculas.

Con el fin de analizar la producción de las proteínas en estudio en sobrenadantes de cultivo se procedió a plaquear, en placas de 6 pocillos, 400.000 cél/ml de células productoras de cada variante (1 y 2) de IFN- β -1a en medio DMEM HAM's F12 5% SFB. Luego de 24h, se cambió el sobrenadante de cultivo por medio DMEM HAM's F12 0,5% SFB. Posteriormente, se cosechó el sobrenadante a las 48h pos-cultivo, para realizar los análisis correspondientes. Este procedimiento se realizó con los sobrenadantes de cultivo de las células productoras presionadas con 200 y 300 μ g/ml de puromicina.

El análisis de la producción de las diferentes variantes de-inmunizadas de IFN- β -1a se realizó mediante un ensayo de ELISA sándwich utilizando rhIFN- β -1a comercial como estándar de referencia. Las concentraciones obtenidas resultaron de 400 - 800 ng/ml para ambas variantes. Resulta conveniente destacar que estas concentraciones de proteína resultan insuficientes para llevar a cabo los procesos de purificación a mayor escala.

Para poder resolver este inconveniente, se propuso llevar a cabo nuevos eventos de transducción, empleando como línea celular de partida aquellas generadas en la etapa previa y presionadas con 200 ug/ml de puomicina, siendo esta condición de selección la que en el ensayo anterior (resultado no mostrado) arrojó las mayores concentraciones de las proteínas en estudio. Por medio de la estrategia propuesta se pudo mejorar notablemente la producción de proteína en sobrenadante de cultivo, alcanzando concentraciones de 15.000 - 20.000 ng/ml para IFN- β -1a(VAR1) y 10.000 ng/ml para IFN- β -1a(VAR2). Estos valores de concentración proteica son acordes a los pretendidos para llevar a cabo la producción y purificación de las proteínas a mediana escala.

3. PURIFICACIÓN DE LAS VARIANTES DE IFN- β MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE PSEUDO-AFINIDAD A COLORANTES Y CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA (HPLC)

La obtención de las moléculas de IFN- β -1a con elevado grado de pureza constituyó una etapa clave para su posterior caracterización.

La purificación de las variantes de IFN- β -1a a partir de sobrenadantes de cultivo se realizó empleando, en una primera instancia, una matriz de pseudo-afinidad *Blue-Sepharose* empaquetada en una columna XK 16/20. Se emplearon 7 ml de resina sin uso previo, la cual permite purificar por cada ml de resina, 50 ml de sobrenadante. Se realizaron 8 y 11 ciclos de purificación para las variantes 1 y 2 respectivamente, realizando sucesivos ciclos de sanitización entre la purificación de una variante y la siguiente, utilizando un cromatógrafo *ÄKTA Start*. Se obtuvo un pico de elución en las fracciones 2 a 4, las cuales fueron colectadas y conservadas entre 2 y 8°C al abrigo de la luz para el próximo paso de purificación.

Los detalles técnicos y el procedimiento de la técnica de purificación no se informan dado que es un protocolo cedido gentilmente por una empresa y se respeta en esta instancia la confidencialidad.

En la Figura 12 se presenta, a modo ilustrativo, el proceso cromatográfico de pseudo-afinidad de IFN- β -1a(VAR1).

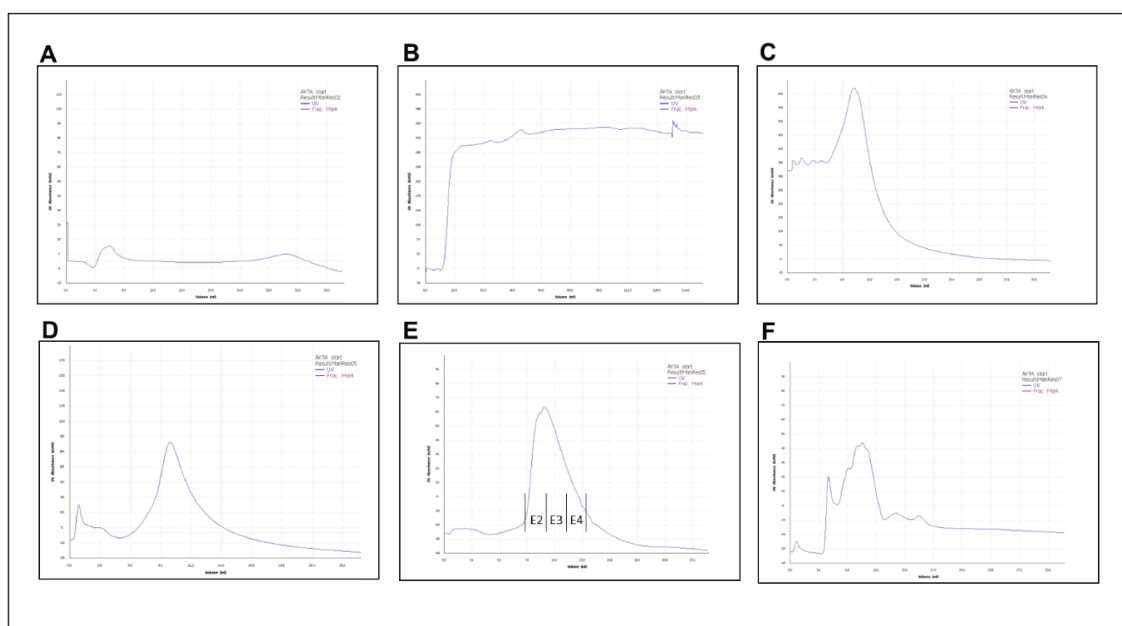


Fig. 12: Purificación de IFN- β -1a(VAR1) mediante cromatografía de pseudo-afinidad. En el cromatograma se representan las señales de absorbancia a $\lambda=280$ nm (azul) en función del volumen de elución: **A-** Equilibrado; **B-** Siembra; **C-** Lavado 1; **D-** Lavado 2; **E-** Elución; **F-** Lavado 3.

La concentración y pureza de las proteínas purificadas se determinaron mediante espectrofotometría a $\lambda=280$ nm y $\lambda=400$ nm y electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (PAGE-SDS) y reductoras, con tinción con azul brillante de *Coomassie*. En la Figura 13A, se muestra el gel obtenido al sembrar muestras de las distintas etapas de un proceso de purificación (siembra, *flow through*, lavados y fracciones de elución) de la variante IFN- β -1a(VAR1), a modo de ejemplo. Las fracciones correspondientes a la elución de cada variante se mezclaron y se determinó la concentración de cada una de ellas por medición espectrofotométrica a $\lambda=280$ nm y a $\lambda=400$ nm (fórmula 5; sección 8.2.1; apartado Materiales y Métodos). Se obtuvieron 6,6 mg de IFN- β -1a(VAR1) y 10 mg de IFN- β -1a(VAR2).

Como se observa en la Figura 13A, si bien se logró concentrar y remover gran parte de las proteínas contaminantes que se encontraban en el sobrenadante, en las fracciones de elución de las purificaciones se observan proteínas contaminantes de alto y bajo peso molecular. Para resolver este inconveniente, se realizó un segundo paso de purificación, constituido por una cromatografía líquida de alta eficiencia, utilizando una columna C4. Todas las fracciones de elución obtenidas en el primer paso de purificación en las que se encontraba la proteína concentrada, se juntaron para conformar un único *pool*. A partir de este *pool* se realizaron siembras de volúmenes entre 25 y 30 ml donde, para cada siembra, el *pool* de purificación fue diluido al medio en una solución de siembra. Teniendo en cuenta la concentración de IFN en el *pool* y la capacidad teórica de la columna se realizaron la cantidad de ciclos cromatográficos

necesarios para purificar la totalidad del volumen de las proteínas en estudio. En la Figura 14 se muestra, a modo de ejemplo, el cromatograma del proceso de purificación mediante cromatografía HPLC de la variante IFN- β -1a(VAR1) .

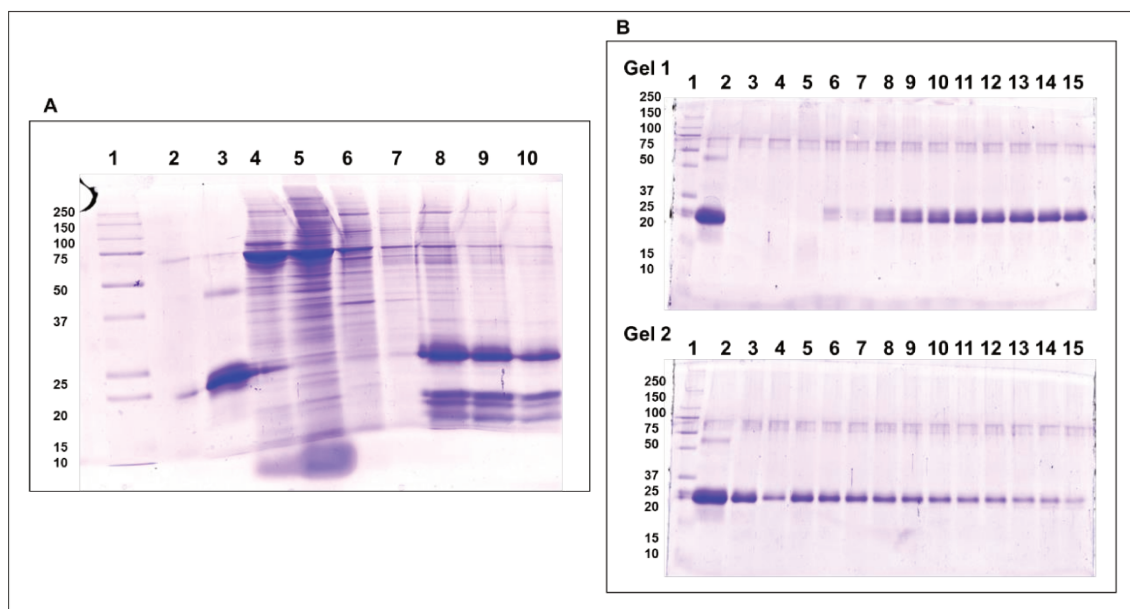


Fig. 13: Geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras (PAGE-SDS). A- Fracciones de una purificación de IFN- β -1a(VAR1) mediante cromatografía de pseudo-afinidad. Referencias: **1:** Marcador de masa molecular; **2:** sin muestra; **3:** Estándar de IFN- β -1a (IFN- β -1a(WT)) (3 ug); **4:** Pool de sobrenadantes de cultivo; **5 y 6:** Lavados 1 y 2; **7-10:** Eluciones 1 a 4. **B-** Fracciones correspondientes a los picos de elución de la purificación por HPLC. **Gel 1:** **1-** Marcador de masa molecular; **2-** Estándar de IFN- β -1a (IFN- β -1a(WT)); **3:** Pre-pico en paso de elución 2; **4:** *flow through*; **5:** Lavado; **6-15:** Eluciones E1 a E10. **Gel 2:** **1-** Marcador de masa molecular; **2-** Estándar de IFN- β -1a (IFN- β -1a(WT)); **3-15:** Eluciones E11 a E23.

En la Figura 13B, se muestra el perfil electroforético obtenido para las diferentes fracciones de elución de un ciclo de purificación de una cromatografía líquida de alta eficiencia. Como se puede observar en las calles donde se sembraron las fracciones de elución, se ha logrado obtener la proteína pura y concentrada, a la altura esperada de 22 KDa, aproximadamente.

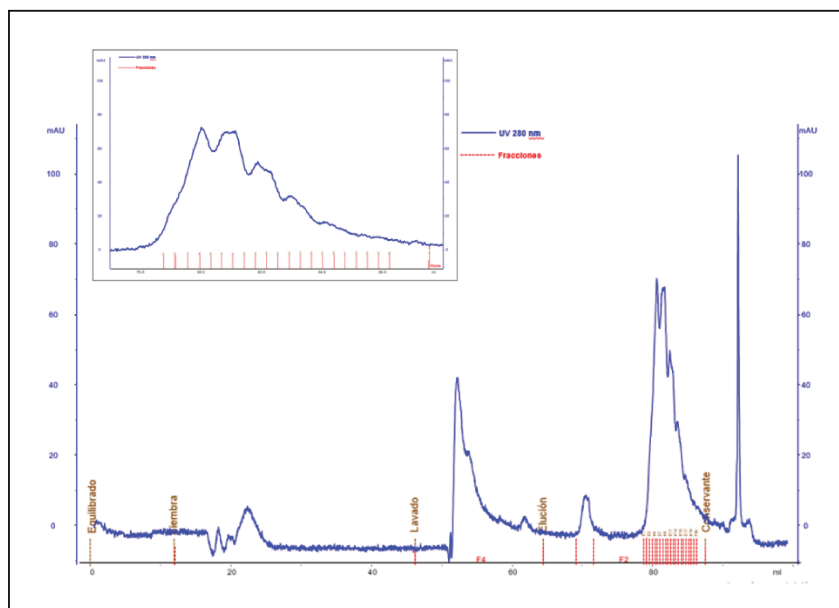


Fig. 14: Purificación de IFN- β -1a(VAR1) mediante HPLC. Cromatograma correspondiente a la purificación de IFN- β -1a(VAR1) presente en el *pool* de elución obtenido durante el primer paso de purificación. Se muestran los registros de absorbancia a 280 nm (azul) y fracciones recolectadas (líneas verticales en rojo). En la esquina superior izquierda se muestra una ampliación del pico de elución.

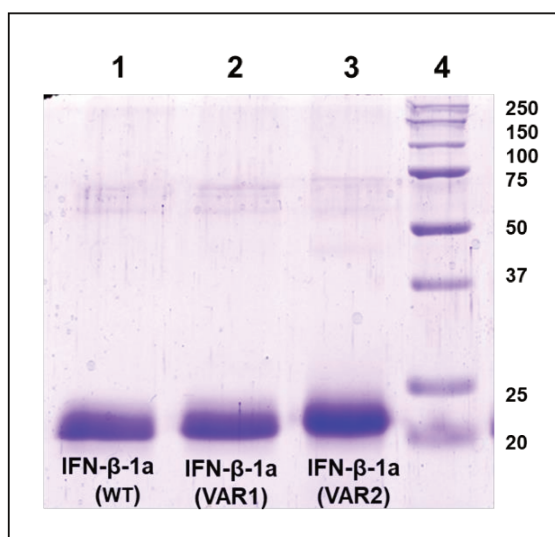


Fig. 15: Evaluación de la pureza de las variantes de-inmunizadas de IFN- β -1a, purificadas, diafiltradas y concentradas. Referencias: **1:** Estándar de IFN- β -1a; IFN- β -1a(WT); **2:** IFN- β -1a(VAR1); **3:** IFN- β -1a(VAR2); **4:** Marcador de masa molecular.

Como último paso de esta etapa, las fracciones de elución de cada proteína fueron colectadas en un *pool* y sometidas a procesos de concentración y diafiltración contra un buffer conformado por los excipientes necesarios para la correcta conservación de las proteínas. Como se observa en la Figura 15, ambas variantes de IFN- β -1a exhibieron una banda principal con

movilidad electroforética similar a la de la proteína original, IFN- β -1a(WT) (rhIFN- β -1a comercial), de aproximadamente 22 kDA, que corresponde al tamaño molecular original. Las concentraciones de las proteínas luego de cada proceso de purificación, el rendimiento y la recuperación se muestran en la Tabla 3. La concentración de cada una de ellas se realizó por medición espectrofotométrica a $\lambda=280$ nm y a $\lambda=400$ nm (fórmula 6; sección 8.3.1; apartado Materiales y Métodos). Se obtuvieron 1,4 mg de IFN- β -1a(VAR1) y 2,1 mg de IFN- β -1a(VAR2).

Tabla 3. Determinación de la recuperación (R) de las purificaciones de IFN- β -1a(VAR1) e IFN- β -1a(VAR2) mediante los procesos de cromatografía de alta eficacia y diafiltración.

<i>Cromatografía de alta eficacia</i>				
Muestra	Volumen (ml)	Concentración (mg/ml)	Masa (mg)	Recuperación (%)
IFN- β -1a(VAR1)	66	0,1	2,888	44
IFN- β -1a(VAR2)	99	0,1	4,498	45

<i>Diafiltración</i>				
Muestra	Volumen (ml)	Concentración (mg/ml)	Masa (mg)	Recuperación (%)
IFN- β -1a(VAR1)	95	0.03	1,4	50
IFN- β -1a(VAR2)	155	0.03	2,1	45

3.1 Confirmación de la identidad de las variantes de IFN- β -1a purificadas mediante ensayos de Western Blot.

Con el fin de confirmar la identidad de las variantes de IFN- β -1a purificadas, se realizaron ensayos de *Western Blot*. Para tal fin, se empleó la proteína recombinante rhIFN- β -1a (IFN- β -1a(WT)) comercial como referencia.

En primer lugar, 1 ug de cada proteína fueron analizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) con el agregado de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) en condiciones reductoras. Para llevar a cabo la reacción de inmunodetección específica del IFN- β -

1a, se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-IFN- β -1a y a continuación anticuerpos anti-inmunoglobulinas de ratón conjugados con la enzima peroxidasa. Por último, se realizó el revelado por quimioluminiscencia. La metodología empleada se describe detalladamente en la sección 8.5.1 del apartado Materiales y Métodos.

Como se observa en la Figura 16, IFN- β -1a(VAR1) e IFN- β -1a(VAR2) fueron reconocidas específicamente por el anticuerpo monoclonal anti-IFN- β -1a y muestran tamaños moleculares similares al IFN- β -1a(WT).

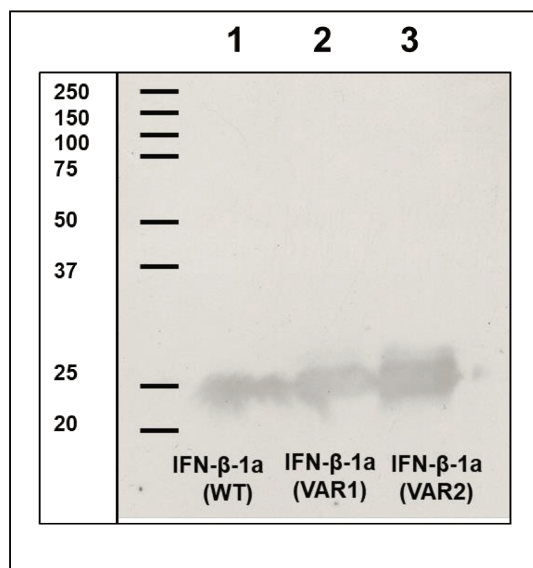


Fig. 16: Las variantes de IFN- β -1a se analizaron mediante la técnica de *Western Blot* comparando el tamaño molecular de dichas proteínas con el IFN- β -1a original. Referencias: 1: IFN- β -1a(WT); 2: IFN- β -1a(VAR1); 3: IFN- β -1a(VAR2). Se indican, además, los marcadores de tamaño molecular empleados en el procedimiento electroforético.

4. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL Y ANALÍTICA DE LAS VARIANTES DE- INMUNIZADAS DE IFN- β -1a

4.1 Valoración de la actividad biológica *in vitro* de las variantes de IFN- β -1a

La estrategia de de-inmunización implementada en este estudio implicó la modificación de los aminoácidos más inmunogénicos en la secuencia del IFN- β -1a, sin afectar los residuos directamente vinculados a la unión al receptor. Para investigar el impacto de estas mutaciones en la actividad biológica *in vitro* del IFN- β -1a, se analizó su actividad antiviral. Los ensayos de valoración biológica antiviral de los interferones 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 interferón para proteger a las células

susceptibles del efecto citopático de un virus lítico para un rango de concentraciones de la citoquina. Existe una gran variedad de sistemas línea celular/virus; en el presente trabajo se empleó el sistema: línea celular WISH/virus de la estomatitis vesicular (VSV).

En la Figura 17A, se muestra, para un ensayo, los datos graficados de absorbancia (DO = 540 nm) en función de los correspondientes valores de actividad antiviral del estándar internacional de IFN- β -1a (NIBSC) y de las diluciones de las muestras en escala logarítmica; y se calcularon los valores de actividad biológica (AB) para cada una de las moléculas mediante comparación con el estándar utilizando el ensayo de rectas paralelas. A partir de estos resultados y realizando el cociente entre la AB y la concentración de las moléculas en las muestras, se determinaron los valores de actividad biológica específica (ABE) de cada proteína, $33,93 \pm 4,00$ UI/ng para IFN- β -1a(WT), $47,52 \pm 7,04$ UI/ng para IFN- β -1a(VAR1) y $41,96 \pm 13,32$ UI/ng para IFN- β -1a(VAR2) (Figura 17B). Los ensayos se realizaron por quintuplicado y los datos se representan como la media $\pm$ DS de ocho experimentos independientes.

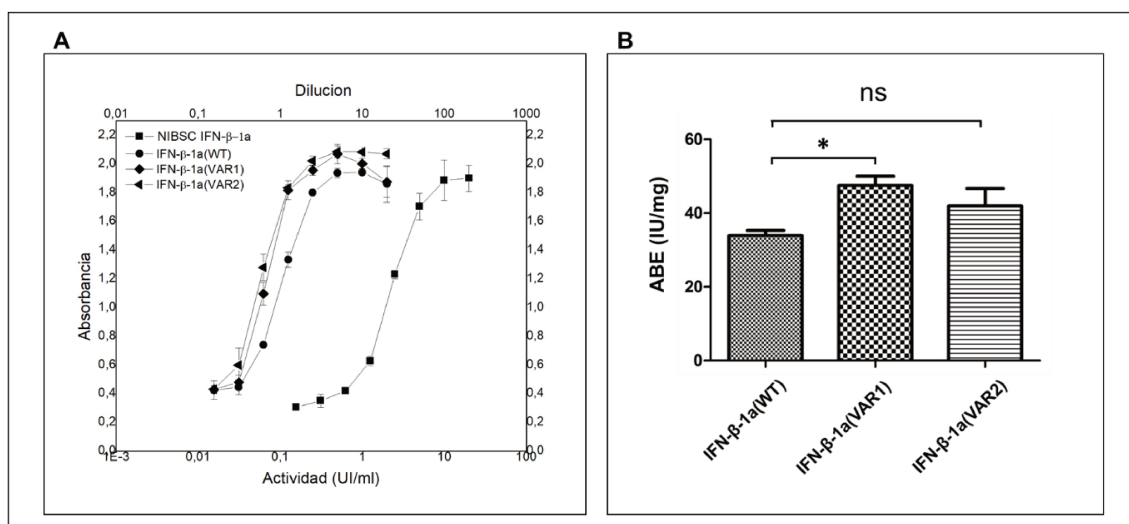


Fig. 17: Valoración de la actividad biológica *in vitro*. **A-** Ensayo de valoración biológica antiviral (AB) de IFN- β -1a(WT) y sus variantes de-inmunizadas: IFN- β -1a(VAR1) e IFN- β -1a(VAR2). La cuantificación de la actividad específica de cada molécula fue determinada a partir de la comparación con un estándar internacional (NIBSC). **B-** Valores de actividad biológica específica (ABE) de cada proteína. Los ensayos se realizaron por quintuplicado y los datos se representan como la media $\pm$ DS de ocho experimentos independientes (* p-Valor es menor a 0,05).

Como se observa en la Figura 17B, las mutaciones introducidas en la secuencia del IFN- β -1a no afectaron negativamente la actividad biológica *in vitro* de la proteína. De hecho, mientras IFN- β -1a(VAR2) mostró una ABE similar a la de la proteína original, IFN- β -1a(VAR1) exhibió un 40% más de actividad antiviral que el IFN- β -1a(WT).

4.2 Análisis de la estructura secundaria y terciaria de las variantes de IFN β -1a mediante Dicroísmo Circular (DC) en UV cercano y lejano

Para investigar si las mutaciones introducidas en la secuencia de IFN β -1a generaron alteraciones estructurales en las variantes de-inmunizadas, comparamos los espectros de dicroísmo circular, los cuales proporcionan evidencia de cambios en la estructura secundaria y terciaria de las proteínas.

En la Figura 18 se muestran los espectros como un promedio de tres adquisiciones repetidas que fueron corregidas restando la señal del buffer en el que se encontraban las proteínas en estudio (excipiente). Los datos del DC fueron expresados como elipticidad molar, en grados por centímetro cuadrado por decimol.

Como se muestra en la Figura 18A, los espectros de dicroísmo circular (UV lejano) de las tres variantes exhiben formas de espectros compatibles con estructuras compuestas de hélice alfa, con bandas negativas a 222 nm y 208 nm y una banda positiva a 193 nm. Sin embargo, IFN β -1a(VAR1) e IFN β -1a(VAR2) exhiben espectros diferentes a los de IFN β -1a(WT). Las distancias de *Manhattan* (Tabla 4) entre IFN β -1a(WT) e IFN β -1a(VAR1) o entre IFN β -1a(WT) e IFN β -1a(VAR2) son diez veces mayores que la distancia de *Manhattan* entre IFN β -1a(VAR1) e IFN β -1a(VAR2). Estos resultados indican un contenido diferente de estructuras secundarias para IFN β -1a(WT) y las variantes de-inmunizadas. Además, observamos un escenario similar al analizar las distancias de *Manhattan* en los espectros UV cercanos.

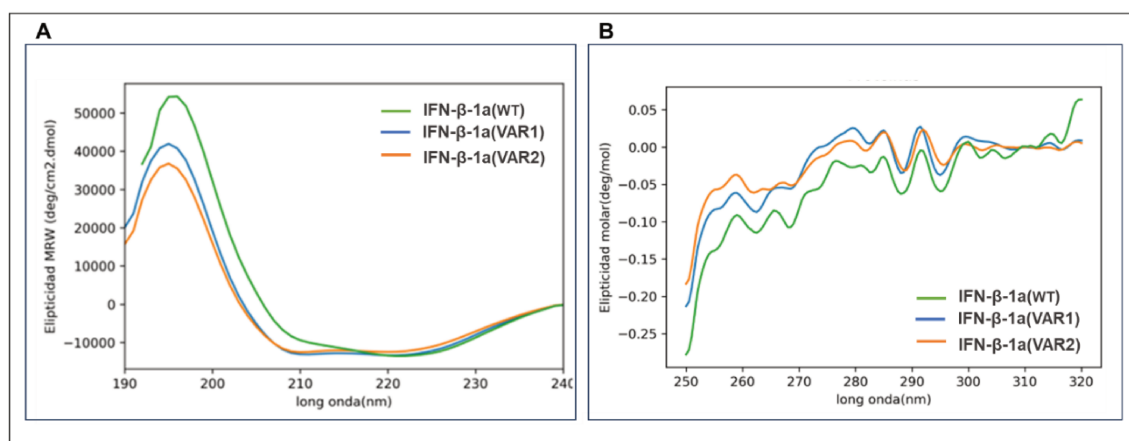


Fig. 18: Espectros de Dicroísmo Circular (DC) en UV cercano y lejano, expresados en elipticidad molar por residuo, de IFN- β -1a(WT) y sus variantes de-inmunizadas. A- 190-240 nm, ultravioleta lejano. B- 250 y 320 nm, ultravioleta cercano.

Tabla 4. Comparación de las distancias de *Manhattan* entre las variantes de IFN- β -1a.

Comparación	<i>Distancias de Manhattan</i>	
	UV lejano	UV cercano
IFN- β -1a(WT)-IFN- β -1a(VAR1)	0,0168	0,0208
IFN- β -1a(WT)-IFN- β -1a(VAR2)	0,0177	0,0137
IFN- β -1a(VAR1)-IFN- β -1a(VAR2)	0,0014	0,0083

5. EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD IN VIVO DE IFN- β -1a Y SUS VARIANTES DE-INMUNIZADAS

Una estrategia atractiva para evaluar la inmunogenicidad *in vivo* de proteínas de uso terapéutico humano se basa en el uso de ratones transgénicos HLA-DRB1. Este modelo animal permite caracterizar o evaluar respuestas inmunitarias con una elevada correlación con los resultados observados en los ensayos clínicos en humanos. Estos animales poseen el *background* genético de la cepa C57BL/6 pero carecen del sistema de presentación antigénica murino y en su lugar expresan los alelos del CMH humano HLA-A*0201 y HLA-DRB1*0301 y, por lo tanto, las respuestas de células T están restringidas por estas moléculas (82, 83). Una limitación que presenta el modelo empleado radica en que la presentación antigénica mediada por un único alelo HLA da como resultado respuestas policlonales poco robustas y con limitada maduración de la afinidad (81). Por este motivo, a los efectos de alcanzar una respuesta inmune detectable, el plan de inmunización empleado en este trabajo incluyó el uso de adyuvantes completo e incompleto de Freund.

El protocolo de inmunización realizado (sección 10, apartado Materiales y Métodos,) consistió en tres inoculaciones intraperitoneales de las proteínas de interés, con empleo de adyuvante. Una vez finalizado, se tomaron muestras de sangre periférica y se realizó el sacrificio de todos los animales, con posterior extracción del bazo y los ganglios linfáticos. Con estas muestras se realizaron ensayos de cuantificación de citoquinas (mIL-4 y mIFN- γ) en los sobrenadantes de cultivo de células esplénicas, mediante ELISA sándwich, y titulación de anticuerpos totales y neutralizantes en plasma de los ratones.

5.1 Análisis de la respuesta inmune celular en ratones transgénicos HLA-DR3. Cuantificación de *mIFN-γ* y *mIL-4* en sobrenadantes de cultivo de células esplénicas estimuladas *ex vivo* con *IFN-β-1a*

En la respuesta inmune T dependiente, uno de los eventos imprescindibles para la activación del linfocito T CD4⁺ es el reconocimiento específico de alguno de los complejos péptido-molécula del CMH-II presentes en la membrana de las CPAs. Durante este proceso de activación, las CPAs producen diferentes citoquinas que polarizan el perfil efector de los linfocitos T CD4⁺. Para el caso de las proteínas terapéuticas, los perfiles T-helper1 (Th1) y T-helper2 (Th2) son los que se establecen con mayor frecuencia y, por lo tanto, son los más estudiados en el análisis de la inmunogenicidad de las mismas (65). El perfil efector Th1 se caracteriza por la producción de IFN-γ, mientras que el perfil Th2 produce citoquinas tales como IL-4, IL-5 e IL-13, entre otras. Es por esto que la detección de estas citoquinas permite inferir y correlacionar la respuesta inmune celular contra un bioterapéutico.

Teniendo en cuenta lo descrito anteriormente, la evaluación final de la respuesta inmune generada por las células T frente a la estimulación *ex vivo* de las células esplénicas aisladas de ratones inmunizados se realizó a partir de la cuantificación de las citoquinas IFN-γ e IL-4.

Para cumplir este objetivo, se inmunizaron 4 grupos de 8 animales cada uno, con las proteínas IFN-β-1a(WT), IFN-β-1a(VAR1) e IFN-β-1a(VAR2) respectivamente, y un grupo control (excipiente). Luego, analizamos las respuestas *in vitro* específicas de células T, inducidas por los interferones, en las muestras de células esplénicas, mediante ensayos de ELISA sándwich (sección 10.4, apartado Materiales y Métodos).

Para realizar la cuantificación de IFN-γ se graficaron los valores de absorbancia en función de las concentraciones de *mIFN-γ* empleado como estándar, en escala logarítmica. La concentración de la citoquina en las muestras se determinó interpolando los valores de absorbancia en la zona lineal de la curva estándar.

La magnitud de la activación de los linfocitos T frente a las distintas variantes del IFN-β-1a se estableció como un índice de estimulación (IE), definido como el cociente entre la concentración de citoquina en la muestra y el valor correspondiente al control de excipiente. En la Tabla 5 se representan los IE obtenidos para las proteínas de interés. Como se puede observar, los IE alcanzados en ratones inoculados con IFN-β-1a(WT) mostraron valores muy superiores a los obtenidos en los animales tratados con las variantes de-inmunizadas. Este resultado pone de manifiesto el éxito de la estrategia de de-inmunización del IFN-β-1a.

Tabla 5. Valores de IE arrojados del análisis comparativo de la inmunogenicidad de IFN- β -1a(WT) y sus variantes de-inmunizadas, a través de la cuantificación de IFN- γ .

Muestra	IE
IFN- β -1a(WT)	16,43
IFN- β -1a(VAR1)	1,64
IFN- β -1a(VAR2)	1,07

Estos resultados fueron analizados por medio de un *test* estadístico, prueba de *Kruskal-Wallis*, que permitió concluir que, como el p-Valor es menor a 0,05 (Valor-P = 0,00112) existen diferencias significativas entre las medianas de los IE analizados para un nivel de confianza del 95%. Luego, el gráfico de cajas y bigotes demuestra que, al no observarse solapamiento entre los cortes de las muescas, existen diferencias significativas entre la mediana de IFN- β -1a(WT) y las medianas de IFN- β -1a(VAR1) e IFN- β -1a(VAR2) (Figura 19).

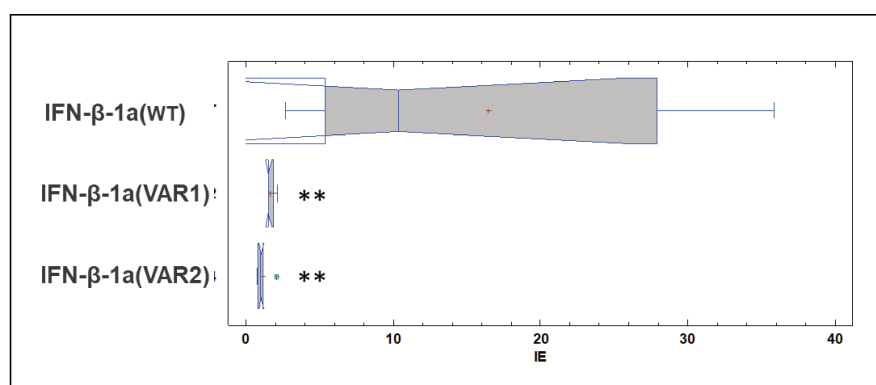


Fig. 19: Comparación de medianas de los índices de estimulación (IE) de mIFN- γ mediante el gráfico de cajas y bigotes, luego de aplicar la prueba estadística de *Kruskal-Wallis*.

Es importante destacar que no fue posible detectar mIL-4 en los sobrenadantes de cultivo evaluados (resultados no mostrados), lo que indicaría que IFN- β -1a induce una respuesta de células T polarizada hacia un perfil de tipo Th1.

5.2 Análisis de la respuesta inmune humoral: Evaluación del título de anticuerpos anti-IFN- β -1a en plasma de ratones transgénicos inmunizados

La respuesta inmune de tipo T dependiente frente a la administración de un bioterapéutico en un paciente involucra la generación de células B de memoria y células plasmáticas de larga vida, capaces de sostener la producción de elevados títulos de anticuerpos durante períodos prolongados. En numerosos casos, estos anticuerpos presentan la capacidad de neutralizar la actividad biológica del terapéutico (20, 46, 47, 49-51). Está demostrado que estos anticuerpos pueden afectar la efectividad y seguridad de la terapia. Es por esto, que la evaluación de la respuesta inmune humoral *in vivo* contra la proteína terapéutica ha alcanzado tal relevancia en la actualidad que se ha convertido en un requerimiento fundamental en el control de calidad a nivel pre-clínico y clínico. Por este motivo, la evaluación de la respuesta *in vivo* humoral contra las proteínas en estudio resulta muy relevante.

Por lo antes expuesto, y dada la estrecha relación entre la respuesta inmune mediada por células T y la generación de anticuerpos, se determinó el título de anticuerpos específicos contra las proteínas IFN- β -1a(WT), IFN- β -1a(VAR1) e IFN- β -1a(VAR2), en muestras de plasma de los animales inmunizados. Este objetivo se llevó a cabo por medio de un ensayo de ELISA indirecto (sección 10.7, apartado Materiales y Métodos). En la Figura 20 se observan las gráficas, para cada grupo de animales, de los valores de absorbancia en función del logaritmo de las diluciones del plasma. Todas las muestras de plasma evidenciaron presencia de anticuerpos específicos anti-IFN- β -1a.

Estos resultados fueron analizados por medio de un *test* estadístico, prueba de *Kruskal-Wallis*, que permitió concluir que, como el p-Valor es menor a 0,05 (Valor-P = 0,043018) existen diferencias significativas entre las medianas de los títulos de anticuerpos totales anti-IFN- β -1a para un nivel de confianza del 95%. En adición, el gráfico de cajas y bigotes demuestra que, al no observarse solapamiento entre los cortes de las muescas, existen diferencias significativas entre la mediana de IFN- β -1a(WT) y las medianas de IFN- β -1a(VAR1) e IFN- β -1a(VAR2) (Figura 21).

Con el objetivo de determinar el título de anticuerpos neutralizantes en el plasma de ratones inmunizados con las distintas variantes de IFN- β -1a, se realizaron ensayos de inhibición de la actividad antiviral protectora. Se llevaron a cabo ensayos de valoración biológica antiviral realizando una pre-incubación (con diluciones seriadas 1:2) del plasma de ratón con una concentración constante de la variante de IFN- β -1a correspondiente (sección 10.8, apartado Materiales y Métodos). De esta manera, aquellos anticuerpos capaces de reconocer y unir al IFN en su sitio activo reducirán la capacidad protectora de la citoquina. Dicha reducción será más

evidente en aquellos pocillos en los que el IFN se haya incubado con el plasma más concentrado, observándose mayor lisis celular. En contraste, aquellos pocillos pre-incubados con diluciones mayores de plasma presentarán mayor efector protector y por ende mayor viabilidad celular.

Se graficaron los datos de absorbancia en función de las diluciones del plasma en escala logarítmica y se calculó el título correspondiente como la inversa del valor de la dilución del plasma que reduce al 50% (IC50) la actividad antiviral inicial de IFN (variantes de IFN incubadas con el plasma control). En la Tabla 6 se muestran los títulos de anticuerpos neutralizantes para los animales de cada uno de los grupos en estudio.

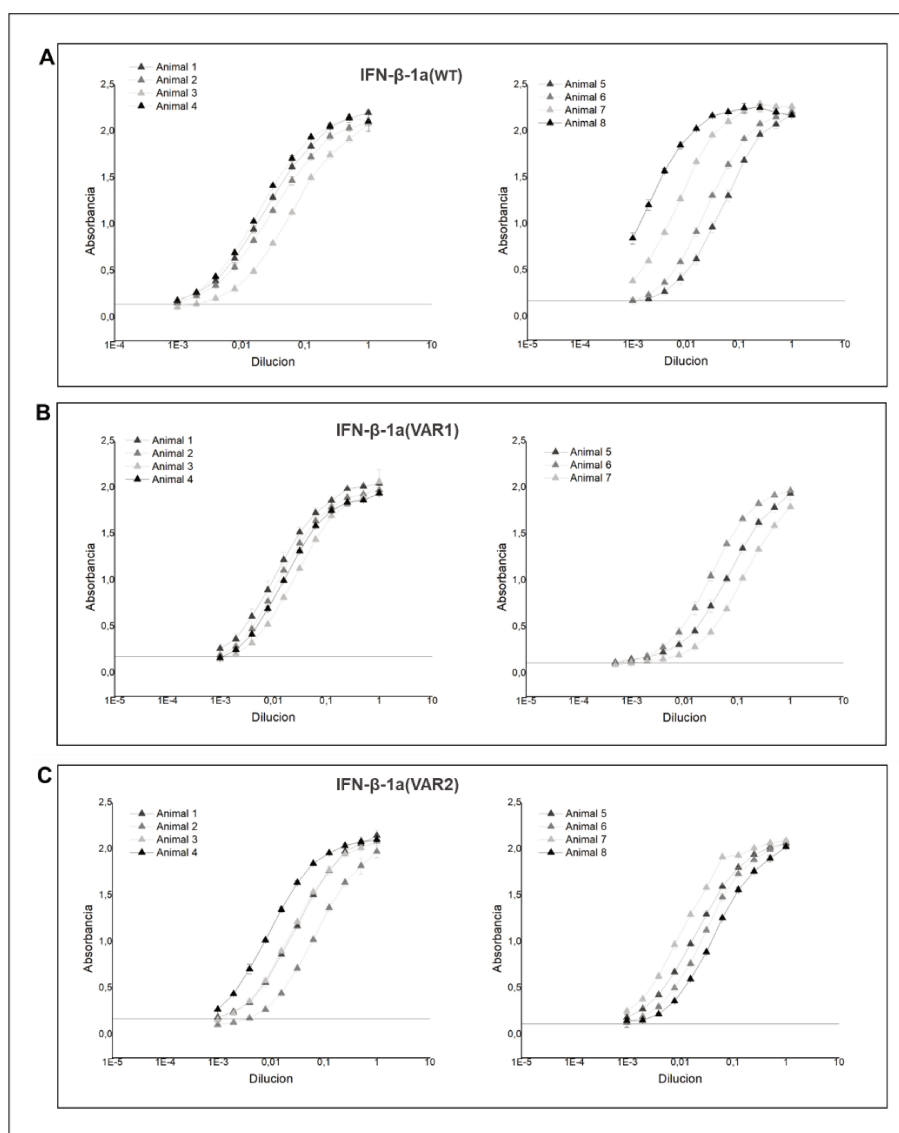


Fig. 20: Ensayo de ELISA indirecto realizado con las muestras de plasma de los animales inoculados con IFN-β-1a(WT) y las variantes IFN-β-1a(VAR1) e IFN-β-1a(VAR2). Gráficas de absorbancia en función del logaritmo de las diluciones del plasma: **A-** Animales inmunizados con IFN-β-1a(WT). **B-** Animales inmunizados con IFN-β-1a(VAR1). **C-** Animales inmunizados con IFN-β-1a(VAR2).

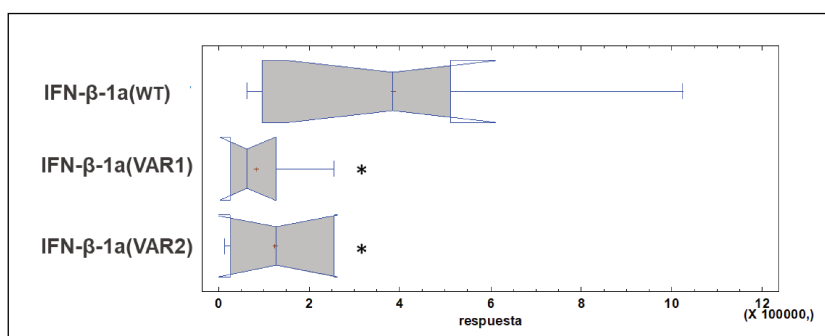


Fig. 21: Comparación de medianas de los títulos de anticuerpos específicos totales anti-IFN- β -1a mediante el gráfico de cajas y bigotes, luego de aplicar la prueba estadística de Kruskal-Wallis.

Tabla 6. Títulos de anticuerpos neutralizantes en ratones inoculados con las distintas versiones de- inmunizadas de IFN- β -1a

	IFN- β -1a(WT)	IFN- β -1a(VAR1)	IFN- β -1a(VAR2)
Animal 1	79,53	0	0
Animal 2	61,36	0	0
Animal 3	56,54	0	0
Animal 4	154,87	0	83,57
Animal 5	106,15	79,53	0
Animal 6	300,12	0	0
Animal 7	-	-	0
Animal 8	-	-	61,76

Los datos fueron analizados mediante el *test* estadístico de Kruskal-Wallis de múltiples muestras. Puesto que el valor-P es menor que 0,05 (Valor-P = 0,00750596), existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel de confianza del 95%. Para determinar cuáles medianas son significativamente diferentes, realizamos un gráfico de cajas y bigotes. Como se puede observar en la Figura 22, no existe solapamiento entre los cortes de las muescas, lo que pone de manifiesto las diferencias significativas entre la mediana de IFN beta-1a(WT) y las medianas de IFN beta-1a(VAR1) e IFN beta-1a(VAR2).

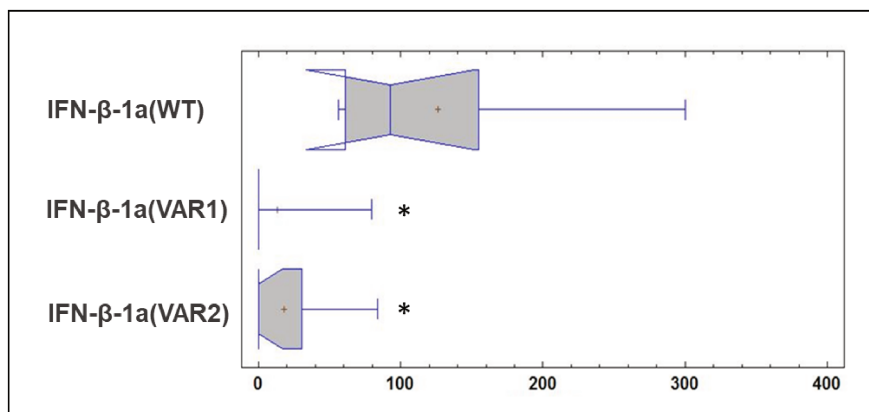


Fig. 22: Comparación de medianas de los títulos de anticuerpos neutralizantes anti-IFN- β -1a mediante el gráfico de cajas y bigotes, luego de aplicar la prueba estadística de Kruskal-Wallis.

Como se puede observar, las muestras de plasma de los ratones inoculados con IFN- β -1a(WT) mostraron una elevada capacidad neutralizante de la actividad antiviral *in vitro* del IFN- β -1a. En contraste, las muestras de plasma de los animales tratados con las versiones de inmunizadas mostraron niveles muy bajos, e incluso indetectables, de anticuerpos neutralizantes. Este estudio es relevante, ya que la presencia de niveles elevados de anticuerpos neutralizantes puede afectar severamente la eficacia y seguridad de la terapia.

6. EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD EX VIVO DE IFN- β -1a Y SUS VARIANTES DE-INMUNIZADAS

Debido a la estrecha relación entre la respuesta inmune mediada por las células T activadas por epitopes presentes en una proteína terapéutica y la intensidad y duración de los anticuerpos antidrogas (ADAs), se han propuesto numerosos métodos experimentales para analizar la activación específica de los linfocitos T. Un ensayo preclínico comúnmente utilizado implica evaluar, mediante técnicas *ex vivo*, la respuesta de las células del sistema inmunológico luego de su exposición a la proteína terapéutica.

6.1 Análisis de la respuesta inmune celular en muestras de células mononucleares de sangre periférica humana (CMSP)

El último objetivo del presente trabajo de Tesis consistió en analizar la respuesta inmune mediada por células T, presentes en muestras de CMSP de pacientes con esclerosis múltiple,

incubadas con las variantes de IFN- β -1a. Para tal fin, se analizaron mediante citometría de flujo, marcadores celulares de activación de linfocitos T, tales como CD69, CD137 y CD154.

En una primera instancia, las muestras de CMSP de dos donantes voluntarios (donantes 1 y 2) fueron incubadas en presencia de IFN- β -1a(WT) y de agentes activadores policlonales de linfocitos T, como controles positivos: MOG (pool de péptidos de la glicoproteína Mielina Oligodendrocito), TT (toxina tetánica) y SEB (enterotoxina B de *Staphylococcus*). Luego, las muestras fueron incubadas en presencia de distintos anticuerpos conjugados a fluorocromos específicos. En particular, se analizó por citometría de flujo, la presencia del marcador celular CD69.

Como se puede observar en la Figura 23, la presencia de IFN- β -1a(WT) activó específicamente linfocitos T vírgenes y de memoria en las muestras de CMSP de los dos donantes analizados. Los valores están expresados en porcentaje de linfocitos T activados con respecto al control negativo (excipientes).

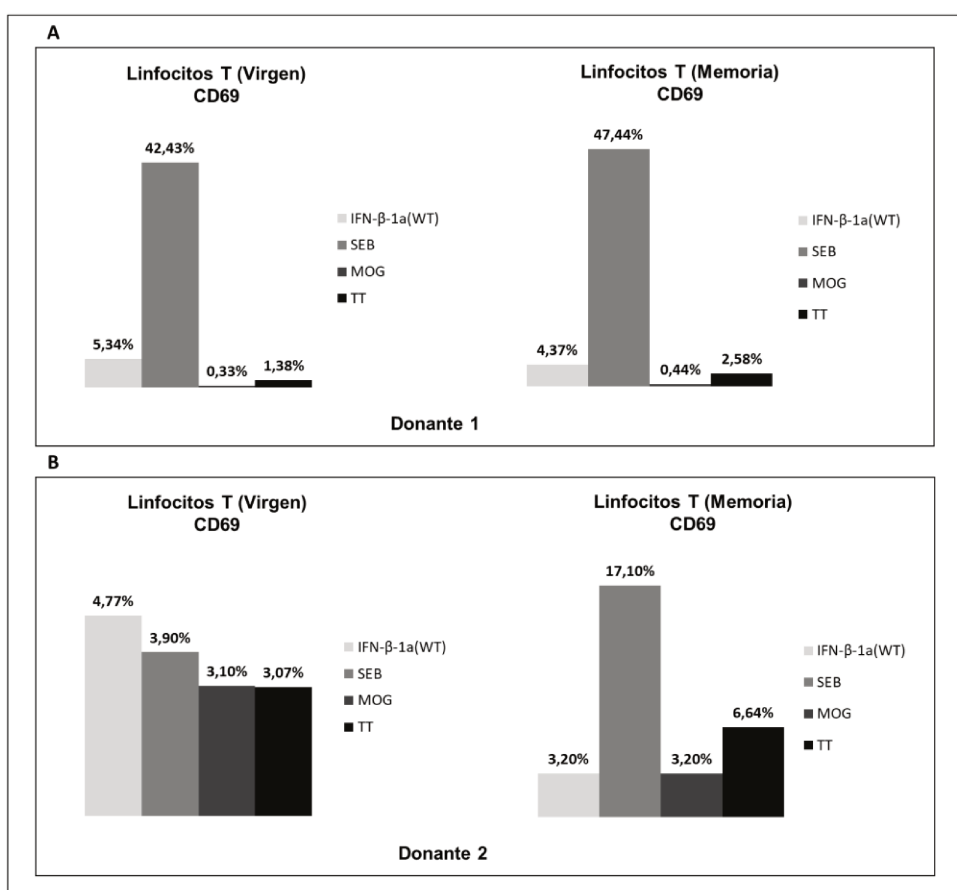


Fig. 23: Activación de linfocitos T vírgenes y de memoria en muestras de CMSP de pacientes con esclerosis múltiple. Análisis por citometría de flujo utilizando el marcador CD69. **A-** Donante 1. **B-** Donante 2.

Los clones de linfocitos T de memoria activados en cada muestra fueron aislados por *cell sorting* y re-estimulados con la proteína original IFN- β -1a(WT), y con sus variantes de-inmunizadas IFN- β -1a(VAR1) y IFN- β -1a(VAR2). En estos ensayos, se utilizó como control positivo a las células tratadas con el mitógeno PMA (forbol 12-miristato 13-acetato) y como controles negativos a las células sin tratamiento o tratadas con excipientes. Los marcadores de activación de linfocitos T utilizados en esta instancia fueron CD69 y CD154.

En la Figura 24 se observan los resultados de la re-estimulación. Los valores se expresan en porcentaje de linfocitos T activados con respecto a la muestra tratada sólo con excipientes. El IFN- β -1a(WT) indujo una elevada activación linfocitaria y superior a la observada para las variantes de-inmunizadas de la proteína. Resulta de particular interés la menor activación linfocitaria observada para IFN- β -1a(VAR2) con respecto a IFN- β -1a(VAR1), lo cual se correlaciona con los resultados obtenidos mediante el análisis *in silico*.

En una segunda instancia se amplió la cohorte analizada incorporando muestras de CMSP de cinco donantes más (Donantes 3 a 7) y se llevaron a cabo las estimulaciones iniciales con las tres proteínas en estudio. En la Tabla 7 se muestran los resultados alcanzados al analizar la activación linfocitaria a partir de la determinación del marcador CD69. Con excepción del donante 6, las muestras de CMSP de los pacientes con esclerosis múltiple mostraron una mayor activación linfocitaria al ser incubadas en presencia del IFN- β -1a(WT), en comparación con las variantes de-inmunizadas. Estos resultados confirman la hipótesis de una menor inmunogenicidad como consecuencia de las mutaciones introducidas en la secuencia del interferón original.

Luego, para confirmar estos resultados, se aislaron los clones de linfocitos T específicos de memoria del donante 4 activados por las tres proteínas en estudio y se re-estimularon nuevamente con IFN- β -1a(WT), IFN- β -1a(VAR1) e IFN- β -1a(VAR2).

En la Figura 25 se representan los valores porcentuales (con respecto a los excipientes) de los linfocitos T de memoria del donante 4 y específicos para IFN- β -1a(WT) re-estimulados con IFN- β -1a(WT). En este caso los marcadores de activación de linfocitos T utilizados fueron CD69, CD137 y CD154. Como se puede observar, y consistente con los resultados representados en la Figura 24, la re-estimulación de los linfocitos T específicos con IFN- β -1a(WT) condujo a un mayor porcentaje de activación que al ser re-estimulados con las proteínas de-inmunizadas.

En las Figuras 26 y 27 se muestran los valores porcentuales de linfocitos T de memoria del donante 4 y específicas para IFN- β -1a(VAR1) e IFN- β -1a(VAR2), respectivamente, re-estimuladas con las distintas variantes de IFN- β -1a.

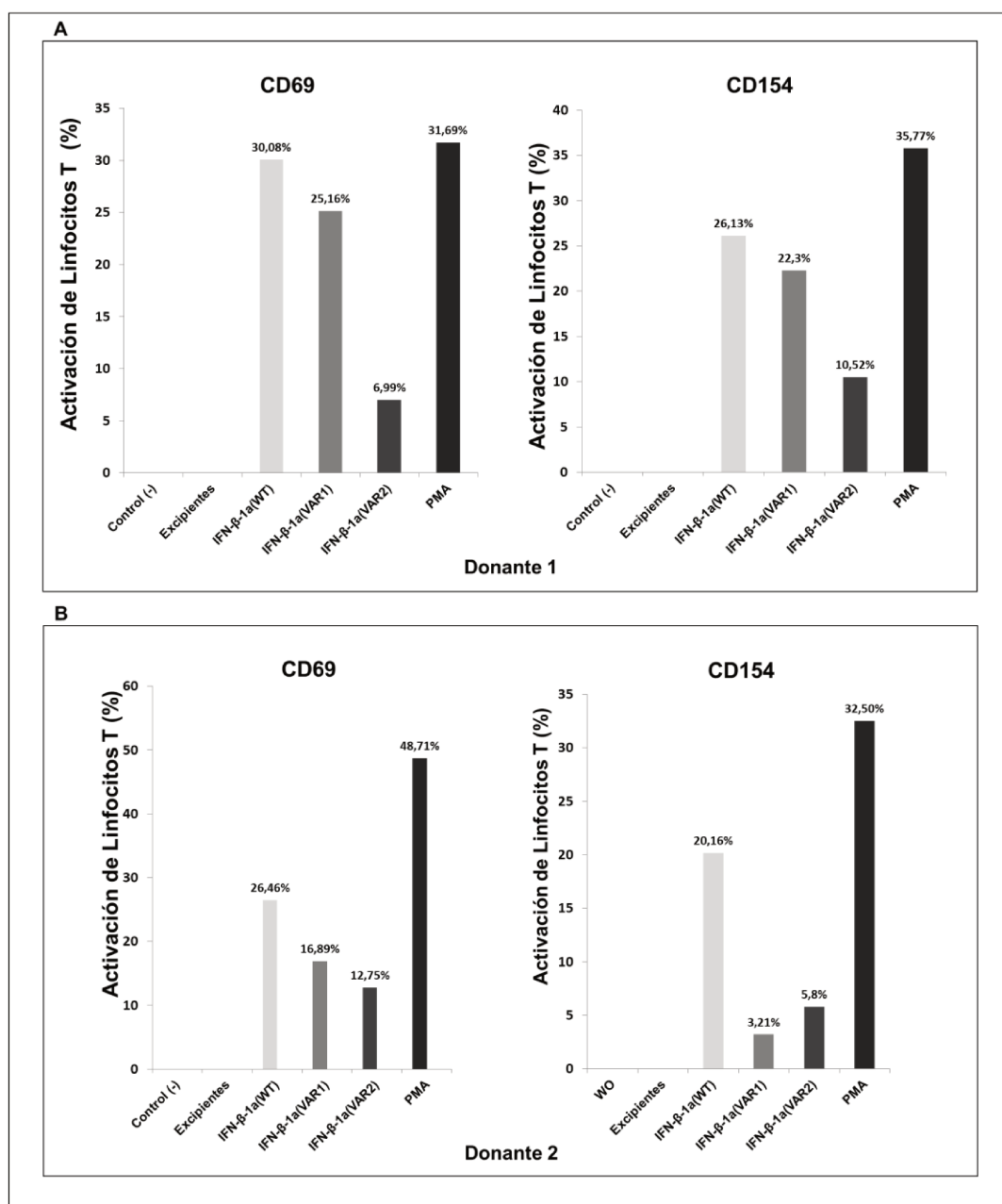


Fig. 24: Re-estimulación de linfocitos T de memoria T en muestras de CMSP de pacientes con esclerosis múltiple. Análisis por citometría de flujo utilizando los marcadores CD69 y CD154. **A-** Donante 1. **B-** Donante 2.

Tabla 7. Porcentaje de activación de linfocitos T vírgenes y de memoria en muestras de CMSP de pacientes con esclerosis múltiple. Análisis por citometría de flujo utilizando el marcador CD69.

Donante 3		
	Linfocitos T (Virgen)	Linfocitos T (Memoria)
IFN-β-1a(WT)	1,44	0,39
IFN-β-1a(VAR1)	1,30	0,38
IFN-β-1a(VAR2)	0,79	0,02
Donante 4		
	Linfocitos T (Virgen)	Linfocitos T (Memoria)
IFN-β-1a(WT)	0,41	1,21
IFN-β-1a(VAR1)	0,08	0,43
IFN-β-1a(VAR2)	0,07	0,34
Donante 5		
	Linfocitos T (Virgen)	Linfocitos T (Memoria)
IFN-β-1a(WT)	1,12	0,47
IFN-β-1a(VAR1)	0,13	0,16
IFN-β-1a(VAR2)	0,16	0,25
Donante 6		
	Linfocitos T (Virgen)	Linfocitos T (Memoria)
IFN-β-1a(WT)	0,04	0,60
IFN-β-1a(VAR1)	-	0,71
IFN-β-1a(VAR2)	-	0,79
Donante 7		
	Linfocitos T (Virgen)	Linfocitos T (Memoria)
IFN-β-1a(WT)	0,13	0,19
IFN-β-1a(VAR1)	0,03	0,08
IFN-β-1a(VAR2)	0,04	0,15

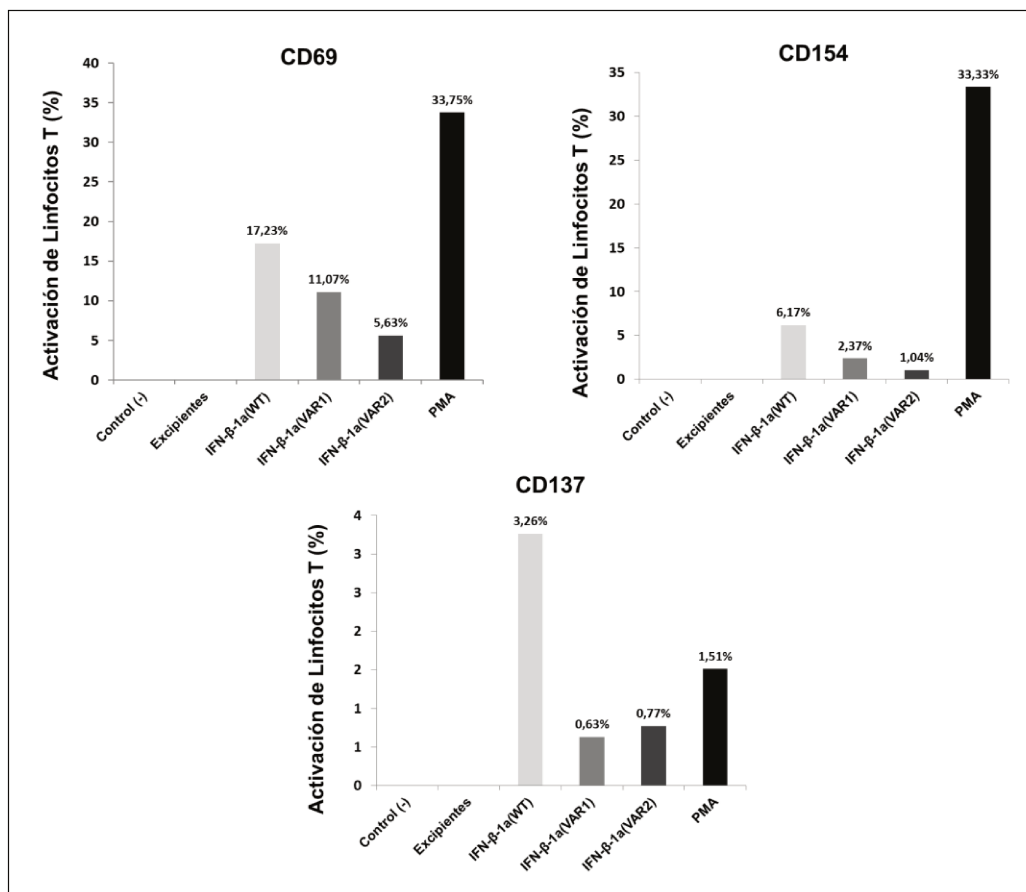


Fig. 25: Re-estimulación de linfocitos T de memoria del donante 4 y específicos para IFN-β-1a(WT) con IFN-β-1a(WT), IFN-β-1a(VAR1) e IFN-β-1a(VAR2). Análisis por citometría de flujo utilizando los marcadores CD69, CD154 y CD137.

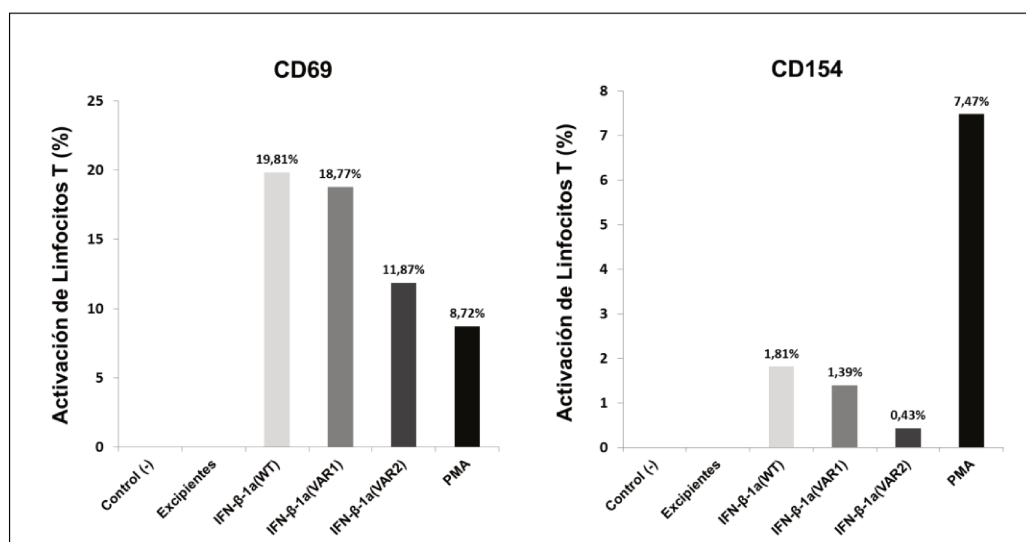


Fig. 26: Re-estimulación de linfocitos T de memoria del donante 4 y específicos para IFN-β-1a(VAR1) con IFN-β-1a(WT), IFN-β-1a(VAR1) e IFN-β-1a(VAR2). Análisis por citometría de flujo utilizando los marcadores CD69, CD154 y CD137.

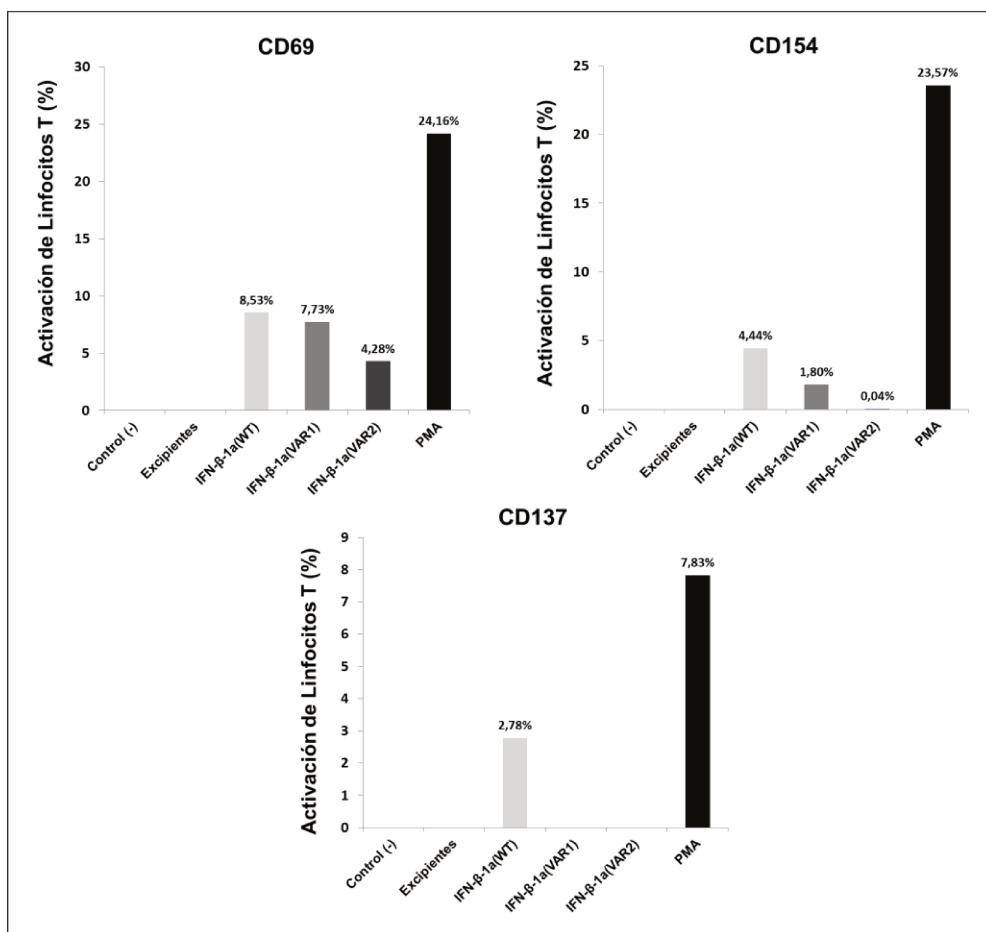


Fig. 27: Re-estimulación de linfocitos T de memoria del donante 4 y específicos para IFN-β-1a(VAR2) con IFN-β-1a(WT), IFN-β-1a(VAR1) e IFN-β-1a(VAR2). Análisis por citometría de flujo utilizando los marcadores CD69, CD154 y CD137.

Resulta de interés destacar que los resultados alcanzados a partir de la re-estimulación de los linfocitos T específicos para las proteínas IFN-β-1a(VAR1) (Figura 26) e IFN-β-1a(VAR2) (Figura 27) evidenciaron un comportamiento similar al observado en la Figura 25. Esto pone de manifiesto el éxito de la estrategia de de-inmunización abordada en el presente estudio.

Discusión

Las proteínas recombinantes de uso terapéutico han cambiado drásticamente el panorama de los tratamientos para muchas enfermedades, proporcionando terapias altamente específicas y eficientes. Los medicamentos basados en proteínas recombinantes son una de las clases de moléculas de fármacos de más rápido crecimiento, que incluyen más de 250 proteínas utilizadas clínicamente para diversas indicaciones. Los avances en la tecnología de producción de proteínas en forma recombinante no sólo allanaron el camino para un suministro masivo de proteínas terapéuticas, sino que, además, mejoraron los perfiles de seguridad al eliminar la transmisión viral que puede ocurrir con proteínas aisladas de fuentes naturales. Además, la comprensión de la enfermedad a nivel molecular contribuyó al crecimiento de las terapias basadas en proteínas, al identificar moléculas claves que afectan la gravedad o la progresión de la enfermedad y aprovechan su potencial terapéutico para proporcionar un tratamiento más apropiado (125).

Lamentablemente, la utilidad clínica de muchas proteínas terapéuticas ha sido socavada por el potencial desarrollo de respuestas inmunes no deseadas contra el producto. La incidencia de la inmunogenicidad de varios productos de eficacia comprobada está bien documentada, y algunos han fallado incluso antes de llegar a los ensayos clínicos (125).

La evaluación y mitigación de la inmunogenicidad es un área compleja que abarca diversas metodologías:

- » Métodos directos: se definen como la medición clínica de respuestas inmunes, incluidas las respuestas de anticuerpos contra el fármaco proteico (126).
- » Métodos indirectos: se definen como tecnologías que miden y/o mitigan factores que podrían estar implicados en la inmunogenicidad, como la agregación, impurezas y partículas sub-visibles (126).
- » Métodos predictivos: son aquellos que intentan imitar las respuestas inmunes humanas contra proteínas terapéuticas e incluyen estrategias *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. En cuanto a las herramientas *in silico*, se destacan los algoritmos inmuno-informáticos de predicción de epitopes T y B. Las herramientas predictivas *in vitro* incluyen ensayos de unión para identificar epitopes potencialmente inmunogénicos y ensayos de activación de células T. Los métodos *in vivo* incluyen animales transgénicos, por ejemplo, cepas de ratones que expresan proteínas

del antígeno leucocitario humano (HLA) o una proteína terapéutica específica (126).

La inmunogenicidad de proteínas terapéuticas puede causar reacciones de hipersensibilidad o anafilaxis, entre otros efectos indeseados. El desarrollo de anticuerpos antidroga (ADAs) puede limitar la eficacia e impactar negativamente en la seguridad, obstaculizando la utilidad clínica de la proteína (125). Por lo tanto, el estudio de tal característica constituye un análisis crítico en el desarrollo de nuevos productos terapéuticos, siendo incluso requerido para la aprobación de los mismos por las principales agencias regulatorias a nivel mundial (127). En efecto, durante las últimas décadas, organismos internacionales, como la FDA en Estados Unidos y la EMA en Europa, han elaborado guías detalladas que incluyen lineamientos y especificaciones acerca de cómo abordar el estudio de la inmunogenicidad de los productos biológicos, en las distintas etapas de su desarrollo. Dentro de estas recomendaciones, el análisis predictivo de la inmunogenicidad de secuencias proteicas y su validación por medio de estudios *in vitro* e *in vivo* se destacan como estrategias que no necesariamente reflejarán exactamente la respuesta inmune en humanos, pero que permiten determinar con cierta precisión el riesgo de inmunogenicidad del producto en etapas pre-clínicas del desarrollo (1-3, 128, 129).

Por lo tanto, teniendo en cuenta la importancia del análisis de la inmunogenicidad de los productos biológicos innovadores, en el presente trabajo de Tesis se emplearon herramientas inmunoinformáticas para analizar la inmunogenicidad del IFN- β -1a.

La administración de IFN- β es uno de los tratamientos más empleados para la Esclerosis Múltiple, enfermedad autoinmune caracterizada por una cascada inflamatoria que generalmente es desencadenada por linfocitos T autorreactivos circulantes que atacan los nervios del sistema nervioso central (SNC). Este escenario inflamatorio generalmente culmina con la desmielinización y pérdida axonal (30).

Si bien el uso de IFN- β como terapia para la EM está establecido hace más de cuatro décadas, un número significativo de pacientes desarrolla anticuerpos neutralizantes contra el medicamento, lo cual puede comprometer tanto la eficacia del tratamiento como la seguridad del paciente (120-122). La incidencia de este fenómeno es variable y depende de múltiples factores, incluyendo el producto, la dosis, la vía de administración y los contaminantes del producto, entre otros. Está ampliamente aceptado que el IFN- β -1b producido en *E. coli* induce la formación de anticuerpos neutralizantes en una proporción mayor de pacientes que los productos derivados de células CHO (45). De hecho, las impurezas que modulan la respuesta inmune innata (IIRMI, por sus siglas en inglés) detectadas exclusivamente en productos fabricados en bacterias, desencadenaron la activación de la vía NF- κ B en células HEK-293 que

expresan los receptores inmunológicos TLR2 y TLR4 (130). Además, recientemente se demostró que esas IIRMI detectadas en un producto terapéutico derivado de *E. coli* pueden modular la expresión de genes específicos involucrados en funciones biológicas (114). La vía de administración también puede desempeñar un rol importante en la inmunogenicidad del IFN- β . Por ejemplo, cuando este medicamento se administra a pacientes con enfermedades virales o cáncer, la vía intravenosa es menos inmunogénica que las vías intramuscular y subcutánea (131, 132).

Si bien las respuestas mediadas por anticuerpos han sido ampliamente caracterizadas, es escaso el conocimiento sobre las respuestas específicas de células T hacia el IFN- β , necesarias para dicha respuesta inmune humoral. Un estudio exhaustivo que involucró a 23 pacientes con esclerosis múltiple tratados con IFN- β , quienes desarrollaron o no anticuerpos antidroga, reveló la presencia de dos regiones inmunodominantes reconocidas por células T en la secuencia de IFN- β -1a. Mientras que la primera (que abarca las posiciones 1-40) provocó una respuesta en todos los pacientes, la segunda (que comprende las posiciones 125-159) indujo una fuerte respuesta de células T preferentemente en los pacientes en los que se detectaron anticuerpos anti-droga (124).

1. DESARROLLO DE VARIANTES DE-INMUNIZADAS DE IFN- β -1a

Mediante ensayos de unión a péptidos, se han identificado tres alelos de HLA de clase II asociados con el desarrollo de anticuerpos contra IFN- β (HLA-DRB1*0401, HLA-DRB1*0408 y DRB1*0701) (63, 70, 84, 133). Además, se han identificado ciertos alelos HLA asociados a un mayor riesgo de desarrollo de EM, mientras que otros pueden ejercer un efecto protector. En particular, los alelos HLA-DRB101:03 y HLA-DRB101:15 mostraron una fuerte asociación con el riesgo de desarrollar EM. En contraste, los alelos HLA-DRB101:01 y HLA-DRB101:11 mostraron un papel protector contra la enfermedad. Además, también se ha encontrado una asociación entre el tipo de alelo HLA y un mayor riesgo de fracaso en el tratamiento (117). Estos resultados sugieren que la tipificación de alelos HLA en pacientes con esclerosis múltiple podría proporcionar un método preciso para identificar a aquellos sujetos que probablemente desarrollen anticuerpos contra IFN- β y, para los cuales, deberían considerarse terapias alternativas.

En el presente trabajo, para analizar la inmunogenicidad potencial del IFN- β -1a se empleó el paquete de herramientas inmunoinformáticas desarrollado por la compañía *EpiVax Inc.* El estudio *in silico* de la inmunogenicidad global arrojó un elevado *score* de inmunogenicidad

para la proteína en estudio. Este resultado es consistente con datos clínicos previamente reportados donde, luego de la administración de INF- β , se detectaron elevados niveles de anticuerpos neutralizantes (120-123). A su vez, para identificar los epitopes inmunodominantes reconocidos por células T en la secuencia de IFN- β -1a, se utilizaron los algoritmos *EpiMatrix* y *ClustiMer*. La evaluación de la inmunogenicidad potencial de cada péptido se lleva a cabo frente a un panel de ocho alelos prototípicos del HLA-DRB1 (DRB1*0101, DRB1*0301, DRB1*0401, DRB1*0701, DRB1*0801, DRB1*1101, DRB1*1301, y DRB1*1501) que representan el 90% de la diversidad de moléculas del CMH-II en la población mundial (70).

Luego, mediante la herramienta ClustiMer, se lograron identificar cuatro clústeres, regiones que presentan gran contenido de epitopes con elevada probabilidad de unión a las moléculas del HLA, donde dos de ellos se solapan con secuencias de epitopes inmunodominantes reconocidos por células T, reportadas previamente en la bibliografía (124). Mientras que las células T comienzan su camino hacia la maduración en el timo, su destino sólo se alcanza en la periferia. Ese proceso comienza cuando las células T vírgenes interactúan con el complejo CMH-péptido en la superficie de las células presentadoras de antígeno a través del receptor de células T. Así se desencadena una serie de eventos moleculares, lo que resulta en la expresión diferencial de marcadores funcionales y fenotípicos que permiten distinguir experimentalmente un tipo de célula T de otro. Las respuestas estimuladoras e inhibitorias son mediadas por las células T efectoras y las células T reguladoras, respectivamente. En general, las células T efectoras producen una respuesta inflamatoria para eliminar infecciones, mientras que las células T reguladoras generan una respuesta supresora que promueve la tolerancia inmunológica. Es por esto que pueden existir epitopes que sean presentados a las células T para estimular células T reguladoras en lugar de células T efectoras. Estos epitopes de células T reguladoras, denominados Tregitopos, cuando se incuban junto con un antígeno objetivo, inducen autotolerancia, lo que podría explicar la relativamente menor inmunogenicidad de los anticuerpos humanizados. De hecho, en un trabajo utilizando las herramientas *Epimatrix*, se encontró que la inmunogenicidad de los anticuerpos monoclonales terapéuticos está correlacionada con su contenido de Tregitopos. Una implicación importante de este concepto es que otras proteínas autólogas también pueden contener epitopes reconocidos por células T reguladoras. Por lo tanto, los epitopes reconocidos por las células T reguladoras también deben ser considerados al abordar la inmunogenicidad de las proteínas (60, 134).

La siguiente instancia en el diseño de las variantes de-inmunizadas de IFN- β -1a involucró la modificación de aquellos aminoácidos que más contribuyen en la inmunogenicidad de cada péptido completo, analizando asimismo la posibilidad de realizar cambios conservativos en la molécula, es decir, evitando la introducción de mutaciones que generen interrupciones

estructurales y/o funcionales en la misma. Esta tarea fue desarrollada a partir de la combinación manual de los datos provenientes del análisis *in silico* y de la información recabada de la bibliografía relacionada con la identificación de aquellos residuos críticos para la actividad del IFN- β (88). Luego, basándonos en estos resultados, seleccionamos un total de ocho mutaciones que fueron introducidas en la secuencia de IFN- β -1a para generar dos variantes de-inmunizadas de IFN- β -1a en células CHO, denominadas IFN- β -1a(VAR1) y IFN- β -1a(VAR2).

2. PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE-INMUNIZADAS

Durante la etapa de producción de las muteínas de-inmunizadas, se analizaron los niveles de expresión de proteína por medio de ensayos de ELISA sándwich. Si bien la resistencia a la presión con puromicina fue la esperada para todas las líneas celulares, se registraron bajos niveles de concentración de proteína en los sobrenadantes de cultivo de las líneas celulares productoras de IFN- β -1a(VAR1) y IFN- β -1a(VAR2). Estos bajos niveles de expresión podrían deberse a factores relacionados con el proceso de integración del transgén y a elementos regulatorios involucrados en el control transcripcional, número de copias del transgén introducidas y sitio de integración en el genoma, procesamiento del ARN, entre otros (135).

Para algunas proteínas un único ciclo de transducción permite lograr una línea celular con el máximo potencial productivo y agregar copias de genes adicionales no mejora la producción de la línea celular. Sin embargo, en otros casos, al aumentar las copias de genes a través de transducciones sucesivas, no sólo se incrementa el número de insertos transgénicos, sino que también se mejoran los niveles de producción de los clones celulares (136). Teniendo en cuenta las cantidades de proteína requeridas en los ensayos posteriores y que los procesos de purificación a mayor escala poseen un bajo porcentaje de recuperación, se planteó llevar a cabo eventos de re-transducción de las líneas celulares productoras para evaluar si, de esta manera, se lograba incrementar la productividad de las líneas celulares y reducir los tiempos de producción. Efectivamente, por medio de la estrategia propuesta se logró mejorar la producción de las proteínas en los sobrenadantes de cultivo.

En los sobrenadantes, junto con la proteína de interés, se encuentran diversos contaminantes que deben ser removidos durante el proceso *downstream*. Esta etapa cumple un rol crucial en la obtención de una proteína recombinante, dado que la misma suele encontrarse en bajos niveles y acompañada de otras proteínas. Remover todas las impurezas, agregados y contaminantes que acompañan a la proteína de interés en el medio de cultivo es concluyente para la continuidad de los ensayos. Como ya se ha mencionado, las impurezas y el estado de

agregación de la proteína, además de otros factores, pueden afectar la inmunogenicidad de la proteína y consecuentemente la generación de ADAs. Por otra parte, en algunos casos, las impurezas pueden actuar como adyuvantes, exacerbando la inmunogenicidad de la proteína terapéutica (63). En un estudio realizado por Barbosa y colaboradores, donde los pacientes fueron tratados con tres formulaciones diferentes de IFN- β durante largos períodos de tiempo, se observó variabilidad en la respuesta y en la propagación de la inmunogenicidad. Los autores le atribuyen este resultado, entre otras fuentes de variabilidad, al efecto de la agregación diferencial y las impurezas presentes en cada formulación (137).

Se han descrito diversos procedimientos para la purificación de interferones. En este trabajo, para cumplir con los objetivos de pureza propuestos, se llevaron a cabo tres etapas de concentración y purificación de las proteínas. Mediante protocolos adecuados de purificación se lograron obtener las proteínas con un elevado grado de pureza. Desde el punto de vista de la masa molecular aparente, los resultados obtenidos fueron los esperados. Si bien ambas variantes exhibieron una banda principal con similar movilidad electroforética a la obtenida para la proteína no de-inmunizada, se observa una pequeña diferencia en el patrón de migración electroforética para IFN-1a- β (VAR2) en comparación con la proteína original.

Aunque las mutaciones se eligieron de manera que no afectaran la estructura de la proteína, el estudio de dicroísmo circular reveló que ambas variantes de-inmunizadas mostraron cambios en la estructura secundaria y terciaria con respecto a la molécula original. Sin embargo, estos cambios estructurales no afectaron negativamente la función biológica *in vitro* de las variantes de-inmunizadas de IFN- β -1a. Más aun, IFN- β -1a(VAR1) exhibió una actividad antiviral *in vitro* superior a la de la proteína no modificada.

El análisis de distancias Manhattan a partir de datos de dicroísmo circular reveló que las estructuras de ambas variantes de-inmunizadas de IFN- β -1a son similares entre sí y diferentes a la proteína original. Además, IFN- β -1a(VAR2) mostró una actividad biológica *in vitro* similar a la del producto de referencia. Por lo tanto, considerando estos resultados en conjunto, la mayor potencia biológica de IFN- β -1a(VAR1) no puede atribuirse a cambios estructurales moleculares.

La función biológica *in vitro* de IFN β -1a está altamente relacionada con su glicosilación. Mastrangeli y colaboradores demostraron que todas las glicoformas del IFN- β ejercen actividad biológica y desempeñan un rol importante en la modulación de la bioactividad de IFN- β -1a, siendo las glicoformas de mayor antenaridad capaces de proporcionar un mejor efecto biológico y más prolongado (138). Por lo tanto, una explicación plausible para la actividad biológica mejorada del IFN- β -1a(VAR1) podría ser que las mutaciones introducidas en la proteína produjeron un cambio en la accesibilidad del sitio para la N-glicosilación, alterando el perfil de glicosilación de la molécula y, consecuentemente, la interacción proteína/receptor en las células

WISH. Está demostrado que el ácido siálico terminal afecta la farmacocinética y las actividades biológicas de la misma (139). Además, dado que en la estructura de la molécula existe un elevado número de residuos hidrofóbicos expuestos en la superficie cerca del sitio de glicosilación (23), se sugirió que la cadena de carbohidratos protege los residuos hidrofóbicos expuestos al solvente para evitar la agregación, aumentar la solubilidad y así favorecer su disponibilidad (18, 23-26).

Sin embargo, será necesario realizar estudios adicionales para confirmar esta hipótesis. Además, un análisis exhaustivo de la glicosilación también podría explicar la pequeña diferencia en el patrón de migración electroforética observado para IFN- β -1a(VAR2) en comparación con la proteína original.

3. EVALUACIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD DE IFN- β -1a Y SUS VARIANTES DE-INMUNIZADAS

Existen diversas herramientas *in silico*, *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* para predecir la inmunogenicidad de las proteínas terapéuticas en la etapa preclínica de su desarrollo.

Las herramientas *in silico* disponibles para la determinación de epitopes se basan en su secuencia y estructura, o bien, derivan de datos experimentales. Ambos enfoques tienen ventajas y desventajas asociadas.

Con respecto a las pruebas *in vitro*, existen varios formatos de ensayo de unión para la determinación de epitopes, utilizando tanto proteínas del CMH purificadas como células que expresan moléculas del CMH (140). En ocasiones, los estudios que evalúan la unión de epitopes a moléculas del CMH tipo II sobreestiman la inmunogenicidad de los bioterapéuticos. Muchos de los epitopes que se unen a las moléculas CMH podrían no activar células T y algunos podrían estar involucrados en mecanismos de tolerancia en lugar de dar lugar a efectos inflamatorios.

Los ensayos *ex vivo*, en cambio, utilizan células mononucleares de sangre periférica o células T y monocitos obtenidos a partir de las muestras de CMSP. La diferenciación *in vitro* de monocitos da lugar a células dendríticas inmaduras, que luego son expuestas al antígeno y posteriormente incubadas con células T (123, 137). El efecto producido por los epitopes inmunogénicos puede evaluarse a través de experimentos que involucran la captación, procesamiento y presentación antigénica por parte de las células dendríticas, que son luego incubadas con linfocitos T autólogos. Luego, la activación de células T puede determinarse de distintas maneras, entre las que se desatacan, la medición de la incorporación de timidina

marcada durante la proliferación celular y la medición de niveles de citoquinas por medio de ensayos de ELISA y ELISPOT.

Actualmente, existen diferentes cepas de ratones transgénicos para llevar a cabo las pruebas de inmunogenicidad *in vivo*. Por ejemplo, los ratones HLA-DR expresan exclusivamente genes HLA-DRB1 humanos. Por otra parte, los ratones tolerantes a proteínas humanas, expresan el bioterapéutico desde etapas tempranas del desarrollo del animal, generando así tolerancia inmunológica hacia la misma (76, 77, 126).

3.1 Análisis de la inmunogenicidad *in vivo*

En este estudio, analizamos la inmunogenicidad de las variantes de IFN- β -1a utilizando un modelo animal que expresa el alelo HLA-DRB1*01:03. De esta manera, aprovechamos las ventajas de una plataforma experimental de inmunogenicidad *in vivo*, para establecer un escenario que incluye componentes celulares y moleculares del sistema inmunológico tal como ocurre en la clínica, en un contexto genético propenso al desarrollo de la EM en humanos (76, 77, 81). Además, los estudios *in vivo* proporcionan una caracterización integrada de los mecanismos subyacentes que desencadenan respuestas inmunes celulares y humores. Estos ratones fueron modificados genéticamente de manera tal que su sistema de presentación antigénica endógeno (H2 de Clase I y II) ha sido eliminado y sustituido por alelos que codifican para proteínas del CMH humano (específicamente HLA-A2.1 y HLA-DR1*01:03). Una limitación que presenta el modelo empleado radica en que la restricción del HLA a un único alelo da como resultado un genotipo homocigota, lo cual es de muy rara ocurrencia en humanos, por lo que este tipo de ratones por lo general carece de la capacidad de montar respuestas policlonales robustas y con maduración de la afinidad (81). Por este motivo, a los efectos de alcanzar una respuesta inmune detectable, el plan de inmunización empleado en este trabajo incluyó el uso de adyuvantes completo e incompleto de Freund.

La utilización de ratones transgénicos que expresan moléculas del HLA-II específicas restringe el enfoque al análisis de la influencia de unas pocas proteínas, del gran número de protagonistas involucrados en la modulación de las respuestas inmunes. Sin embargo, las moléculas del HLA-II son esenciales en la presentación antigénica a los linfocitos T CD4⁺, estando incluso involucradas en la generación del repertorio de linfocitos T CD4⁺ en el timo y en la regulación de la respuesta inmune adaptativa que involucra a este tipo de linfocitos en la periferia. Por este motivo, el uso de estos animales transgénicos constituye un modelo muy acertado para evaluar la inmunogenicidad *in vivo* de las proteínas de uso terapéutico.

En esta etapa del trabajo, se inmunizaron 4 grupos de 8 animales cada uno, con las proteínas IFN- β -1a(WT), IFN- β -1a(VAR1) y IFN- β -1a(VAR2) respectivamente, y un grupo control (excipiente). Luego, analizamos las respuestas *in vitro* específicas de células T, inducidas por los interferones, en las muestras de células esplénicas. La magnitud de la activación de los linfocitos T frente a las distintas variantes del IFN- β -1a se estableció como un índice de estimulación (IE).

Cuando se analizó el IFN- β -1a(WT), se observó una alta respuesta inmune de células T (IE: 16,43), especialmente con un perfil de inmunogenicidad polarizado hacia Th-1. Esto es consistente con un informe previo que muestra la liberación de IFN- γ en cultivos celulares de CMSP de pacientes con esclerosis múltiple tratados con IFN- β -1a y re-estimados con péptidos derivados de IFN- β (124). Interesantemente, se observó una marcada reducción en las respuestas específicas de células T en muestras de células esplénicas re-estimadas con las versiones de-inmunizadas de IFN- β -1a desarrolladas en este estudio IFN- β -1a(VAR1) (IE: 1,64) e IFN- β -1a(VAR2) (IE: 1,07).

A excepción de las muestras estimuladas con lectinas como agente mitógeno (control positivo) no fue posible detectar IL-4 murina en los sobrenadantes de cultivo evaluados. Dada la acción mutuamente antagónica que ejercen ambas citoquinas (IFN- γ e IL-4), esto no resulta sorprendente, y es posible suponer que la respuesta polarizada hacia un perfil de tipo Th1, inhibió la producción de IL-4 por parte de los linfocitos T activados, favoreciendo a la vez la secreción de IFN- γ . Por tal motivo, el análisis de la inmunogenicidad *in vivo* se vio restringido al estudio de la producción de IFN- γ como indicador de la activación linfocitaria. En oposición, algunos estudios han demostrado que la ausencia de IL-4 se puede deber a que la cantidad de células productoras de esta citocina en sangre periférica y/o células mononucleares es muy baja (141, 142). Por lo tanto, optimizar el límite de detección del ensayo de ELISA utilizado o cambiar el método de detección permitirían resolver esta limitación.

Los resultados obtenidos a partir de la titulación de anticuerpos totales específicos anti-IFN- β también mostraron una reducción significativa en las muestras de plasma de ratones inmunizados con IFN- β -1a(VAR1) e IFN- β -1a(VAR2) en comparación con el plasma de aquellos animales tratados con la proteína original. Además, este comportamiento también fue evidente al evaluar la capacidad neutralizante de la actividad antiviral en muestras de plasma derivadas de ratones tratados con las distintas versiones de IFN- β -1a. La obtención de bajos títulos de anticuerpos neutralizantes de la actividad biológica para ambas proteínas de-inmunizadas reviste una gran importancia, ya que éstos pueden inhibir la capacidad de estas proteínas de ejercer su acción, lo cual impacta en forma directa en la eficacia de estos candidatos terapéuticos.

3.2 Análisis de la inmunogenicidad *ex vivo*

Los algoritmos empleados para evaluar la inmunogenicidad potencial de una proteína de uso terapéutico en base a su contenido de epitopes reconocidos por células T requieren de un extenso proceso de validación, de manera tal de acotar la discrepancia entre estos estudios y los ensayos clínicos. En este trabajo, la evaluación del efecto de la reducción del contenido total de epitopes para células T debido a las mutaciones introducidas en cada variante de IFN- β -1a se llevó a cabo por medio de un ensayo experimental *ex vivo*. Para ello, analizamos la respuesta inmune mediada por células T, presentes en muestras de CMSP de pacientes con esclerosis múltiple, incubadas con las variantes de IFN- β -1a. Para tal fin, se analizaron mediante citometría de flujo marcadores celulares de activación de linfocitos T, tales como CD69, CD137 y CD154.

La citometría de flujo de alta dimensionalidad permite evaluar la expresión simultánea de múltiples proteínas de membrana e intracelulares a nivel de la célula individual y la delineación del sistema inmune humano, tanto en estado sano como en el contexto de enfermedades. Esta avanzada tecnología ha contribuido significativamente a la comprensión de los mecanismos de enfermedades. Los recientes desarrollos de citometría de flujo de múltiples parámetros prometen proporcionar aún mayores perspectivas en la inmunología humana (74).

Particularmente, los ensayos de Marcadores Inducidos por Activación (MIA) han demostrado ser un medio accesible y rápido para la detección de células T específicas de antígenos. El método generalmente implica la incubación a corto plazo de sangre entera o células mononucleares de sangre periférica con antígenos de interés, donde las células presentadoras de antígenos autólogas procesan y presentan péptidos en complejo con moléculas del CMH. El reconocimiento de los complejos péptido-CMH por los receptores de células T induce la sobreexpresión de marcadores de activación en las células T que pueden ser detectados mediante citometría de flujo. Con la selección adecuada de marcadores de superficie y tiempo de estimulación, los ensayos MIA permiten identificar y caracterizar más fácilmente una amplia gama de respuestas de células T específicas de antígeno en comparación con los ensayos actuales de proliferación o secreción de citocinas. Con el rápido avance de la citometría de flujo de alta dimensionalidad, es posible emparejar la identificación de células T específicas de antígeno con el análisis fenotípico y ensayos de proliferación. Este enfoque utiliza marcadores de superficie celular previamente identificados para caracterizar o clasificar la respuesta de células T específicas de antígeno, permitiendo obtener una comprensión más profunda de la respuesta inmune adaptativa (75).

La detección de receptores de quimiocinas en la superficie celular es ampliamente utilizada para identificar subconjuntos de células T de manera *ex vivo*. Cuando esto se combina con ensayos MIA, el fenotipado derivado a través de receptores de quimiocinas se convierte en una herramienta poderosa para identificar los subconjuntos celulares que constituyen una respuesta específica de antígeno. Notablemente, las células T *naive*, de memoria efectora y de memoria central pueden ser fácilmente identificadas mediante la expresión de CD45RA, CD45RO y CCR7 (*naive*: CCR7⁺CD45RA⁺CD45RO⁻; memoria efectora: CCR7⁻CD45RA⁻CD45RO⁺; memoria central: CCR7⁺CD45RA⁻CD45RO⁺) (143). En nuestro trabajo, este fue un punto de partida fundamental para determinar las diferentes poblaciones celulares y su respuestas frente a las proteínas IFN β -1a(WT), IFN β -1a(VAR1) e IFN β -1a(VAR2).

CD69 es una proteína transmembrana tipo II de lectina que se encuentra principalmente como marcador temprano de activación/inducible expresado en células T, ya que se reclutan rápidamente a la superficie celular después de la estimulación. CD69 induce diferentes vías de señalización en diferentes tipos celulares. Como marcador temprano de activación, la transcripción de CD69 se inicia tan pronto como 30 minutos a 1 hora después de la activación de los linfocitos T y es detectable de 2 a 3 horas después de la estimulación; aunque el nivel de CD69 disminuye después de 4 a 6 horas. CD69 se expresa en cantidades mínimas en linfocitos en reposo, y ciertos subtipos de células de memoria y las células Treg expresan este marcador de manera constante en su superficie celular (75, 144). Diferentes tipos de activadores, incluidos los IFNs tipo I, son conocidos por inducir una rápida expresión de CD69 por los leucocitos T *in vitro* e *in vivo*. La expresión de CD69 está asociada con la regulación de la salida de células T del timo y los órganos linfoides periféricos. La expresión de CD69 por las células Treg CD4⁺ ya ha sido bien caracterizada; sin embargo, hay linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ no reguladores que expresan CD69⁺ una vez activados. Todas estas células que expresan CD69 participan en la regulación de las respuestas inmunitarias a través de CD69 en su superficie celular. Además, investigaciones tanto *in vitro* como *in vivo* han revelado que, bajo condiciones inflamatorias crónicas, CD69 se expresa de manera persistente en células T (144).

Esta información es consistente con nuestros resultados, en los que todas las muestras de CMSP de los donantes con EM evidenciaron una activación basal de linfocitos T tanto vírgenes como de memoria. Resulta conveniente destacar que, en correlación con los resultados del análisis de inmunogenicidad *in vivo*, la activación linfocitaria T en muestras de pacientes con EM siempre fue menor cuando las muestras fueron tratadas con las versiones de IFN- β -1a de inmunizadas.

La activación completa de los linfocitos T requiere señales tanto de los receptores de células T como de moléculas co-estimuladoras. Además de CD28, varias moléculas de células T

pueden proporcionar señales co-estimatorias, incluyendo CD154, que interactúa principalmente con CD40 en las células B. CD40 es una molécula crítica que regula varias funciones de las células B, como la producción de anticuerpos, la formación de centros germinales y la proliferación celular (145). En el presente trabajo hemos analizado CD154 como otro de los marcadores celulares de activación de linfocitos T. El ligando de CD40 (CD40L; CD154), miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF), fue uno de los primeros receptores de superficie en ser utilizado y validado para ensayos MIA. CD40L fue originalmente descrito para las células T CD4⁺ y posteriormente ampliado para su uso con células T CD8⁺. Se expresa de manera transitoria en células T CD4⁺ y CD8⁺ en respuesta a la estimulación antigénica, y las células T CD40L⁺ producen grandes cantidades de citoquinas como IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ y TNF dependiendo del estímulo (75). Sin embargo, tras la unión a su receptor CD40, CD40L se regula descendiendo rápidamente dentro de las 6 horas de activación. Es probable que la activación cause que CD40L cicle entre la superficie celular y el citoplasma, ya que se ha detectado intracelularmente dentro de células productoras de IFN- γ estimuladas con antígenos del VIH en pacientes infectados por dicho virus. Para contrarrestar esta regulación negativa, se puede agregar un anticuerpo fluorescente anti-CD40L durante la estimulación *in vitro*. Esta técnica fue descrita por primera vez por Chattopadhyay y colaboradores, donde, aunque la expresión superficial de CD40L alcanzó su pico a las 6 horas, el complejo proteína-anticuerpo pudo detectarse hasta 24 horas después de la estimulación (146).

Nuestros resultados demostraron el incremento en la proporción de linfocitos T que expresan el marcador CD154 en todas las muestras de CMSP tratadas con las tres proteínas en estudio. Más aún, se observó una menor expresión del marcador en las células tratadas con las variantes de-inmunizadas.

La expresión aumentada de CD40 y CD154 ocurre en células efectoras inmunes y células no inmunes en diferentes enfermedades autoinmunes. Además, se han observado beneficios terapéuticos al bloquear la interacción CD40-CD154 en animales con artritis inducida por colágeno. Dado el éxito terapéutico de ciertos biopterapéuticos que bloquean la co-estimulación CD28 y eliminan las células B en el tratamiento de la artritis autoinmune, la inhibición del eje CD40-CD154 tiene dos ventajas: atenuar la co-estimulación mediada por CD154 en células T y suprimir la estimulación de células B mediada por CD40. Además, el bloqueo de la interacción CD40-CD154 promueve la conversión de células T CD4⁺ a células T reguladoras que median la inmunosupresión. Actualmente, varios productos biológicos que apuntan al eje CD40-CD154 han sido desarrollados y están siendo sometidos a ensayos clínicos en fases tempranas con éxito en varias enfermedades autoinmunes, incluyendo la artritis autoinmune (145).

Recientemente se identificó una nueva subpoblación de linfocitos mielínicos específicos CD49d⁺CD154⁺ presentes en sangre periférica de pacientes con EM durante la etapa de remisión, que proliferaron *in vitro* en respuesta a péptidos de mielina. Estos linfocitos poseen la capacidad única de migrar hacia las células precursoras de oligodendrocitos (CPOs) en maduración y de sintetizar quimiocinas/citoquinas proinflamatorias. El co-cultivo de CPOs en maduración con linfocitos mielínicos específicos CD49d⁺CD154⁺ se caracterizó por el aumento en la secreción de quimiocinas/citoquinas proinflamatorias. Además, las CPOs en maduración expuestas a péptidos de mielina exógenos lograron inducir la proliferación de linfocitos CD49d⁺CD154⁺ dependiente de CD40-CD154. Mediante ensayos *in vivo*, confirmaron la presencia de células CD49d⁺CD154⁺ cerca de CPOs en maduración y placas de re-mielinización durante la remisión de la enfermedad en el modelo de ratón de EM (ratones C57Bl/6 inmunizados con MOG35-55) mediante inmunohistoquímica. Tres semanas después de una fase aguda de encefalomiелitis autoinmune experimental, se encontró que las células CD49d⁺/CD154⁺ estaban co-localizadas con células O4⁺ (progenitores de oligodendrocitos) en las áreas de re-mielinización identificadas por el etiquetado de la proteína básica de mielina. Estos datos sugieren que los linfocitos mielínicos específicos de la mielina CD49d⁺CD154⁺ presentes en el cerebro pueden interferir con la re-mielinización mediada por oligodendrocitos, probablemente como resultado de establecer un ambiente proinflamatorio (147). Por lo tanto, la menor proporción de células T que expresan CD154 en muestras de CMSP tratadas con las variantes de-inmunizadas de IFN- β -1a destacan a dichas proteínas como potenciales bioterapéuticos.

Además, estudios de diferentes patologías infecciosas, demostraron que la interacción CD40/CD154 es necesaria para la óptima activación y maduración de células presentadoras de antígenos, con su consecuente producción de IFN- γ pero no de IL-4, información que podría justificar también nuestros resultados *in vivo* de respuestas polarizadas hacia un perfil Th1 (148).

Otro marcador validado para ensayos MIA y analizado en el presente trabajo incluye el miembro de la superfamilia del receptor del TNF, 4-1BB (CD137). La activación de las células T a través del TCR induce la regulación positiva de CD137, que, a través de la unión de su ligando, CD137L, en células presentadoras de antígenos promueve la proliferación y producción de citoquinas por las células T. Es importante señalar que CD137 se puede combinar con CD69 para detectar células T CD8⁺ específicas de antígenos, con una expresión óptima en la superficie a las 24 horas después de la activación. Aunque está mejor validado para detectar células T CD8⁺, CD137 también se expresa en células T CD4⁺ tan pronto como 6 horas después de la activación, y combinado con la falta de expresión de CD40L, permitiría detectar de manera estable las células Treg humanas en cultivos a largo plazo. Por lo tanto, dentro de las 6 horas de activación, cuando CD40L sólo se regula positivamente en células no reguladoras, la combinación de CD137

y CD40L podría diferenciar poblaciones de células T CD4⁺ específicas de antígenos reguladoras y efectoras (75).

CD137 se expresa transitoriamente en células T tras la activación y se une a su ligando, CD137L, el cual se expresa en células presentadoras de antígenos como células dendríticas, macrófagos y células B. La señalización de CD137 co-estimula células T específicas de antígenos activadas y potencia las respuestas inmunitarias. Al mismo tiempo, la señalización inversa de CD137L hacia las CPA que expresan CD137 induce proliferación, diferenciación y maduración, lo que mejora su capacidad de presentación de antígenos. El efecto co-estimulador potente de CD137 está implicado en la autoinmunidad. La señalización de CD137/CD137L potencia la inflamación y aumenta el reclutamiento de monocitos a los sitios de inflamación. CD137 soluble (sCD137), generado por empalme diferencial, se encuentra en niveles elevados en sueros de pacientes con enfermedades autoinmunes, incluyendo artritis reumatoide (AR) y esclerosis múltiple (EM) (149).

El potente efecto co-estimulador de CD137 ha sido implicado en varios modelos murinos de enfermedades autoinmunes. CD137 co-estimula y polariza células T específicas de antígenos hacia una respuesta Th1 potente, y es esencial para el desarrollo de la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), un modelo murino de esclerosis múltiple (EM). En un estudio que tuvo como objetivo investigar el papel de CD137 en la EM, se utilizó inmunohistoquímica e inmunofluorescencia en tejidos cerebrales de pacientes con EM para identificar la expresión de CD137. Se identificaron células CD137⁺ en las muestras analizadas, siendo las lesiones activas las que presentaron la frecuencia más alta de células CD137⁺. La expresión de CD137 se encontró en varios subconjuntos de leucocitos, incluyendo células T, células B y células endoteliales. Experimentos *in vitro* demostraron que el compromiso de CD137 en células B activadas aumentó la secreción temprana de TNF y la secreción persistente de IL-6, junto con un aumento en la proliferación celular. Estas células B CD137⁺ podrían interactuar con células que expresan CD137L, secretar citocinas proinflamatorias y acumularse en el infiltrado meníngeo. El estudio demostró la expresión de CD137 por células B activadas, la mejora de la actividad inflamatoria de las células B tras el compromiso de CD137, y proporciona evidencia de un papel patogénico de las células B CD137⁺ en la EM (149). Por lo antes expuesto, la menor activación linfocitaria T, medida a través del marcador CD137, constituye una evidencia adicional del éxito de las variantes de-inmunizadas como bioterapéuticos para la EM.

En conjunto, estos resultados destacan el éxito de la estrategia de de-inmunización realizada en este trabajo de Tesis. Sin embargo, se necesitarán experimentos adicionales para confirmar la inmunogenicidad reducida de las variantes de IFNβ-1a desarrolladas en este estudio, utilizando una cohorte ampliada de muestras de CMSP humana que comprendan un

repertorio más amplio de alelos HLA. Además, otro tema a abordar es la implicancia potencial de las impurezas en las variantes de IFN β -1a (114). En este trabajo, el nivel de pureza de IFN β -1a purificado y sus variantes de-inmunizadas fue superior al 96.5%. Incluso cuando las variantes de-inmunizadas desarrolladas aquí exhibieron una reducción marcada de la respuesta inmune celular y humoral *in vivo* y *ex vivo* en comparación con la proteína original, será relevante identificar la naturaleza de estas contaminaciones. Por lo tanto, se necesitarán estudios adicionales utilizando ensayos basados en células reporteras dotadas de receptores de la inmunidad innata para identificar dichas entidades y su papel potencial en la inmunogenicidad de IFN β -1a. Por último, estudios futuros enfocados en la interacción con el receptor y el análisis de los patrones de glicosilación permitirán determinar la causa subyacente de la mayor actividad biológica de IFN β -1a(VAR1).

Conclusiones

La administración de IFN- β humano recombinante constituye el principal tratamiento de la esclerosis múltiple. Dos tipos de IFN- β se utilizan terapéuticamente: IFN- β -1a producido en células de ovario de hámster chino (CHO), con una secuencia de aminoácidos idéntica y patrones de glicosilación similares a los de la proteína humana endógena. El segundo, es IFN- β -1b producido en *Escherichia coli* que es, por lo tanto, no glicosilado. Esta proteína es menos potente y estable que la primera debido a la falta de glicosilación. Por otra parte, sin la cadena de glicanos, la proteína puede agregarse formando complejos unidos por puentes disulfuro, lo cual generalmente se asocia con un aumento de la inmunogenicidad y una disminución de la eficacia terapéutica (20).

El riesgo de inducción de reacciones inmunes indeseadas constituye uno de los atributos críticos de los bioterapéuticos. En numerosos casos se ha reportado que la administración de una proteína terapéutica durante períodos prolongados puede dar lugar a un quiebre de la tolerancia inmunológica frente a la droga e incluso frente a antígenos propios, dando como resultado la producción de ADAs, que pueden unirse a la droga inhibiendo su efecto o provocando una alteración en su farmacocinética (49, 55, 150). Una de las principales desventajas del empleo del IFN- β como agente terapéutico es la producción de anticuerpos anti-IFN. En este contexto, el objetivo del presente trabajo de Tesis se centró en el análisis de la inmunogenicidad de la proteína IFN- β -1a y en el desarrollo de variantes con inmunogenicidad reducida, sin causar un impacto negativo en su estructura y función biológica.

La de-inmunización de proteínas terapéuticas consiste en la identificación y modificación de residuos específicos que disminuyan la afinidad de unión al CMH-II de los epitopes (derivados de dichas proteínas) reconocidos por células T. En particular, en el presente trabajo se llevó a cabo un análisis *in silico* empleando las herramientas inmunoinformáticas comprendidas dentro de la interfase ISPRI (*EpiVax Inc.*) que permitió identificar cuatro regiones potencialmente inmunogénicas en la proteína. Una vez identificados los epitopes potenciales y las mutaciones a introducir en sus secuencias para reducir su inmunogenicidad, en adición al conocimiento previo de aquellos residuos críticos para mantener la estructura y la actividad del IFN- β -1a, fue posible diseñar dos variantes de-inmunizadas.

A partir de las secuencias nucleotídicas de cada variante de IFN- β -1a de-inmunizada se generaron las partículas lentivirales correspondientes, que luego se utilizaron para transducir células CHO-K1 y generar líneas celulares estables productoras de cada proteína. En esta instancia, se registraron bajos niveles de concentración de proteína en los sobrenadantes de

cultivo de las líneas celulares productoras de IFN- β -1a(VAR1) y IFN- β -1a(VAR2), situación que fue resuelta por medio de eventos de re-transducción de las líneas celulares. A continuación, mediante protocolos adecuados de purificación se lograron obtener las proteínas con un elevado grado de pureza y con rendimientos de producción de cada proteína acordes con los requeridos para la realización de los ensayos subsiguientes. Los resultados obtenidos del ensayo de SDS-PAGE revelaron que, si bien ambas variantes exhibieron una banda principal con similar movilidad electroforética a la obtenida para la proteína no de-inmunizada, se observó una pequeña diferencia en el patrón de migración electroforética para IFN-1a- β (VAR2) en comparación con la proteína original. Además, se confirmó la identidad de las variantes mediante ensayos de *Western Blot*, donde IFN- β -1a(VAR1) e IFN- β -1a(VAR2) fueron reconocidas específicamente por el anticuerpo monoclonal anti-IFN- β -1a.

La caracterización funcional *in vitro* de IFN- β -1a(VAR1) e IFN- β -1a(VAR2) puso en evidencia valores de actividad biológica antiviral específica de 47,52 UI/ng y 41,96 UI/ng, respectivamente, con respecto a su contraparte no modificada que arrojó una ABE de 33,93 UI/ng. De esta manera, concluimos que las mutaciones introducidas en la secuencia del IFN- β -1a no afectaron negativamente la actividad biológica *in vitro* de la proteína. De hecho, mientras IFN- β -1a(VAR2) mostró una ABE similar a la de la proteína original, IFN- β -1a(VAR1) exhibió un 40% más de actividad antiviral que IFN- β -1a(WT).

Por otro lado, a partir de la caracterización estructural de las proteínas mediante diroísmo circular, se observó que las estructuras de ambas variantes de-inmunizadas de IFN- β -1a son similares entre sí y diferentes de la proteína original. Estos resultados indican un contenido diferente de estructuras secundarias para IFN- β -1a(WT) y las variantes de-inmunizadas. Si bien estos resultados requieren de un análisis estructural a futuro más exhaustivo, las mutaciones introducidas en las variantes no afectaron la actividad biológica *in vitro* de las mismas.

Por otra parte, se realizó un análisis de caracterización de la inmunogenicidad potencial *in vivo* de las variantes de-inmunizadas de IFN- β -1a, empleando ratones transgénicos, cuyo sistema de presentación antigénica endógeno ha sido sustituido por alelos que codifican para proteínas del CMH humano (HLA-A2.1 y HLA-DR1). La evaluación final de la respuesta inmune generada por las células T frente a la estimulación *ex vivo* de las células esplénicas aisladas de ratones inmunizados se realizó a partir de la cuantificación de la citoquina IFN- γ . Los IE alcanzados en ratones inoculados con IFN- β -1a(WT) mostraron valores muy superiores a los obtenidos en los animales tratados con las variantes de-inmunizadas. Además, notablemente, los títulos de anticuerpos específicos, tanto totales como neutralizantes, para los grupos de ratones inoculados con las variantes fueron significativamente más bajos que los

correspondientes al grupo tratado con la proteína original. Estos resultados ponen de manifiesto el éxito de la estrategia de de-inmunización del IFN- β -1a.

Finalmente, los ensayos *ex vivo* con células del sistema inmune humano de pacientes con esclerosis múltiple permitieron determinar el impacto de las mutaciones en la inmunogenicidad de las variantes de IFN- β -1a. En esta instancia, se analizaron mediante citometría de flujo, marcadores celulares de activación de linfocitos T, tales como CD69, CD137 y CD154. A partir de los resultados obtenidos se pudo observar una disminución en la inmunogenicidad *ex vivo* para ambas variantes de-inmunizadas, en todas las muestras analizadas para todos los marcadores utilizados.

En conclusión, utilizando herramientas *in silico* para el análisis de la inmunogenicidad y estabilidad estructural de proteínas, seguido de validación experimental, logramos desarrollar nuevas versiones de IFN β -1a con una inmunogenicidad notablemente reducida y plena actividad biológica *in vitro*. Por lo tanto, las nuevas versiones de IFN β -1a desarrolladas en este estudio constituyen candidatos terapéuticos prometedores para el tratamiento de la esclerosis múltiple.

Bibliografía

1. European Medicines Agency. Guideline on Similar Biologic Medicinal Products Containing Monoclonal Antibodies-Non-Clinical and Clinical. 2012.
2. Blandizzi C, Galeazzi M, Valesini G. Transitioning from first- to second-generation biosimilars: An appraisal of regulatory and post-marketing challenges. *Pharmacological Research*. 2017; 128: p. 306–314. doi: 10.1016/j.phrs.2017.10.015.
3. Knezevic I, Griffiths E. WHO standards for biotherapeutics, including biosimilars: an example of the evaluation of complex biological products. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2017; 1407: p. 5–16. doi: 10.1111/nyas.13434.
4. Pestka S, Krause C, Walter M. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological Reviews*. 2004; 202: p. 8–32. doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.00204.x.
5. Raniga K, Liang C. Interferons: Reprogramming the Metabolic Network against Viral Infection. *Viruses*. 2018; 10: p. 1-21. doi: 10.3390/v10010036.
6. Shors T. Virus: estudio molecular con orientación clínica Argentina: Editorial Médica Panamericana S.A.; 2009.
7. Lazear H, Schoggins J, Diamond M. Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity*. 2019; 50: p. 907-923. doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.025.
8. Alspach E, Lussier D, Schreiber R. Interferon γ and Its Important Roles in Promoting and Inhibiting Spontaneous and Therapeutic Cancer Immunity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2019; 11: p. 1-20. doi: 10.1101/cshperspect.a028480.
9. Kotenko S, Gallagher G, Baurin V, Lewis-Antes A, Shen M, Shah N, et al. IFN- λ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nature Immunology*. 2003; 4: p. 69–77. doi: 10.1038/ni875.
10. Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore T, et al. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nature Immunology*. 2003; 4: p. 63–68. doi: 10.1038/ni873.
11. Schreiber G. The molecular basis for differential type I interferon signaling. *The Journal of Biological Chemistry*. 2017; 292: p. 7285-7294. doi: 10.1074/jbc.R116.774562.
12. Fainboim D, Geffner J. Introducción a la inmunología humana Argentina: Editorial Médica Panamerica S.A.; 2008.
13. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Inmunología celular y molecular España: Elsevier; 2018.

14. Ivashkiv L, Donlin L. Regulation of type I interferon responses. *Nature Reviews. Immunology*. 2014; 14: p. 36-49. doi: 10.1038/nri3581.
15. Chen K, Liu J, Cao X. Regulation of type I interferon signaling in immunity and inflammation: A comprehensive review. *Journal of Autoimmunity*. 2017; 83: p. 1-11. doi: 10.1016/j.jaut.2017.03.008.
16. Goodbourn S, Didcock L, Randall R. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures. *Journal of General Virology*. 2000; 81: p. 2341–2364. doi: 10.1099/0022-1317-81-10-2341.
17. Haji Abdolvahab M, Mofrad MR, Schellekens H. Interferon Beta: From molecular level to therapeutic effects. *International Review of Cell and Molecular Biology*. 2016; 326: p. 343-372. doi: 10.1016/bs.ircmb.2016.06.001.
18. Conradt H, Egge H, Peter-Katalinic J, Reiser W, Siklosi T, Schaper K. Structure of the carbohydrate moiety of human interferon-beta secreted by a recombinant Chinese hamster ovary cell line. *The Journal of Biological Chemistry*. 1987; 262: p. 14600-14605. [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(18\)47838-6/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(18)47838-6/pdf).
19. Rao D, Ramu C, Rao J, Narasu M, Rao A. Cloning, high expression and purification of recombinant human intereferon-beta-1b in *Escherichia coli*. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 2009; 158: p. 140-154. doi: 10.1007/s12010-008-8318-9.
20. Farrell R, Marta M, Gaeguta A, Souslova V, Giovannoni G, Creeke P. Development of resistance to biologic therapies with reference to IFN- β . *Rheumatology*. 2012; 51: p. 590-599. doi: 10.1093/rheumatology/ker445.
21. Jaitin D, Roisman L, Jaks E, Gavutis M, Piehler J, Van der Heyden J, et al. Inquiring into the differential action of interferons (IFNs): an IFN- α 2 mutant with enhanced affinity to IFNAR1 is functionally similar to IFN- β . *Molecular and cellular biology*. 2006; 26: p. 1888-1897. doi: 10.1128/MCB.26.5.1888-1897.2006.
22. Loignon M, Perret S, Kelly J, Boulais D, Cass B, Bisson L, et al. Stable high volumetric production of glycosylated human recombinant IFN α 2b in HEK293 cells. *BMC Biotechnology*. 2008; 8:65. doi: 10.1186/1472-6750-8-65.
23. Karpusas M, Nolte M, Benton C, Meier W, Lipscomb W, Goelz S. The crystal structure of human interferon b at 2.2-Å resolution. *Biochemistry*. 1997; 94: p. 11813–11818. doi: 10.1073/pnas.94.22.11813.
24. Karpusas M, Whitty A, Runkel L, Hochman P. The structure of human interferon-beta: implications for activity. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 1998; 54: p. 1203-1216. doi: 10.1007/s000180050248.

25. Solá R, Griebenow K. Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009; 98: p. 1223-1245. doi: 10.1002/jps.21504.
26. Arduini R, Strauch K, Runkel L, Carlson M, Hronowski X, Foley S, et al. Characterization of a soluble ternary complex formed between human interferon-beta-1a and its receptor chains. *Protein Sciences*. 1999; 8: p. 1867-1877. doi: 10.1110/ps.8.9.1867.
27. Pestka S, Kelder B, Familletti P, Moschera J, Crowl R, Kempner E. Molecular weight of the functional unit of human leukocyte, fibroblast, and immune interferons. *Journal of Biological Chemistry*. 1983; 258: p. 9706-9709. [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(17\)44554-6/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(17)44554-6/pdf).
28. Jacobs L, O'Malley J, Freeman A, Ekes R. Intrathecal interferon reduces exacerbations of multiple sclerosis. *Science*. 1981; 214: p. 1026-1028. doi: 10.1126/science.6171035.
29. Jakimovski D, Kolb C, Ramanathan M, Zivadinov R, Weinstock-Guttman B. Interferon β for Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2018; 8. doi: 10.1101/cshperspect.a032003.
30. Dhib-Jalbut S, Marks S. Interferon-beta mechanisms of action in multiple sclerosis. *Neurology*. 2010; 74: p. 17-24. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181c97d99.
31. Walton C, King R, Rechtman L, Kaye W, Leray E, Marrie R, et al. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Multiple Sclerosis*. 2020; 26: p. 1816-1821. doi: 10.1177/1352458520970841.
32. Dhib-Jalbut S. Mechanisms of action of interferons and glatiramer acetate in multiple sclerosis. *Neurology*. 2002; 58: p. S3-9. doi: 10.1212/wnl.58.8_suppl_4.s3.
33. Kieseier B. The mechanism of action of interferon- β in relapsing multiple sclerosis. *CNS Drugs*. 2011; 25: p. 491-502. doi: 10.2165/11591110-000000000-00000.
34. Kozovska M, Hong J, Zang Y, Li S, Rivera V, Killian J, et al. Interferon beta induces T-helper 2 immune deviation in MS. *Neurology*. 1999; 53: p. 1692-1697. doi: 10.1212/wnl.53.8.1692.
35. Liu Z, Pelfrey C, Cotleur A, Lee J, Rudick R. Immunomodulatory effects of interferon beta-1a in multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*. 2001; 112: p. 153-162. doi: 10.1016/s0165-5728(00)00403-3.
36. Chen M, Chen G, Nie H, Zhang X, Niu X, Zang Y, et al. Regulatory effects of IFN-beta on production of osteopontin and IL-17 by CD4+ T Cells in MS. *European Journal of Immunology*. 2009; 39: p. 2525-2536. doi: 10.1002/eji.200838879.

37. Guo B, Chang E, Cheng G. The type I IFN induction pathway constrains Th17-mediated autoimmune inflammation in mice. *Journal of Clinical Investigation*. 2008; 118: p. 1680-1690. doi: 10.1172/JCI33342.
38. Mirandola S, Hallal D, Farias A, Oliveira E, Brandão C, Ruocco H, et al. Interferon-beta modifies the peripheral blood cell cytokine secretion in patients with multiple sclerosis. *International Immunopharmacology*. 2009; 9: p. 824-830. doi: 10.1016/j.intimp.2009.03.004.
39. Salama H, Kolar O, Kolar Y, Zhang J. Effects of combination therapy of beta-interferon 1a and prednisone on serum immunologic markers in patients with multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*. 2003; 9: p. 28-31. doi: 10.1191/1352458503ms865oa.
40. Avolio C, Filippi M, Tortorella C, Rocca M, Ruggieri M, Agosta F, et al. Serum MMP-9/TIMP-1 and MMP-2/TIMP-2 ratios in multiple sclerosis: relationships with different magnetic resonance imaging measures of disease activity during IFN-beta-1a treatment. *Multiple Sclerosis*. 2005; 11: p. 441-446. doi: 10.1191/1352458505ms1193oa.
41. Jin S, Kawanokuchi J, Mizuno T, Wang J, Sonobe Y, Takeuchi H, et al. Interferon-beta is neuroprotective against the toxicity induced by activated microglia. *Brain Research*. 2007; 1179: p. 140-146. doi: 10.1016/j.brainres.2007.08.055.
42. Boutros T, Croze E, Yong V. Interferon-beta is a potent promoter of nerve growth factor production by astrocytes. *Journal of Neurochemistry*. 1997; 69: p. 939-946. doi: 10.1046/j.1471-4159.1997.69030939.x.
43. Biernacki K, Antel J, Blain M, Narayanan S, Arnold D, Prat A. Interferon beta promotes nerve growth factor secretion early in the course of multiple sclerosis. *Archives of Neurology*. 2005; 62: p. 563-568. doi: 10.1001/archneur.62.4.563.
44. Hermeling S, Crommelin D, Schellekens H, Jiskoot W. Structure-immunogenicity relationships of therapeutic proteins. *Pharmaceutical Research*. 2004; 21: p. 897-903. doi: 10.1023/b:pham.0000029275.41323.a6.
45. Bertolotto A, Deisenhammer F, Gallo P, Sölberg Sørensen P. Immunogenicity of interferon beta: differences among products. *Journal of Neurology*. 2004; 251: p. 1115-1124. doi: 10.1007/s00415-004-1204-7.
46. Ross C, Clemmesen K, Svenson M, Sørensen P, Koch-Henriksen N, Skovgaard G, et al. Immunogenicity of interferon-beta in multiple sclerosis patients: influence of preparation, dosage, dose frequency, and route of administration. *Danish Multiple Sclerosis Study Group. Annals of Neurology*. 2000; 48: p. 706-712. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1531-8249%28200011%2948%3A5%3C706%3A%3AAID-ANA3%3E3.0.CO%3B2-V?sid=nlm%3Apubmed>.

47. Cohen B, Oger J, Gagnon A, Giovannoni G. The implications of immunogenicity for protein-based multiple sclerosis therapies. *Journal of the Neurological Sciences*. 2008; 275: p. 7-17. doi: 10.1016/j.jns.2008.08.003.
48. Yeung V, Chang J, Miller J, Barnett C, Stickler M, Harding F. Elimination of an immunodominant CD4+ T cell epitope in human IFN-beta does not result in an in vivo response directed at the subdominant epitope. *Journal of Immunology*. 2004; 172: p. 6658-6665. doi: 10.4049/jimmunol.172.11.6658.
49. De Groot A, Scott D. Immunogenicity of protein therapeutics. *Trends in Immunology*. 2007; 28: p. 482-490. doi: 10.1016/j.it.2007.07.011.
50. Haselbeck A. Epoetins: differences and their relevance to immunogenicity. *Current Medical Research and Opinion*. 2003; 19: p. 430-432. doi: 10.1185/030079903125002063.
51. Tovey M, Lallemand C. Safety, Tolerability, and Immunogenicity of Interferons. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2010; 3: p. 1162-1186. doi: 10.3390/ph3041162.
52. Liu G, Fairchild P, Smith R, Prowle J, Kioussis D, Wraith D. Low avidity recognition of self-antigen by T cells permits escape from central tolerance. *Immunity*. 1995; 3: p. 407-415. doi: 10.1016/1074-7613(95)90170-1.
53. Bouneaud C, Kourilsky P, Bousso P. Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity*. 2000; 13: p. 829-840. doi: 10.1016/s1074-7613(00)00080-7.
54. Kyewski B, Derbinski J. Self-representation in the thymus: an extended view. *Nature Reviews. Immunology*. 2004; 4: p. 688-698. doi: 10.1038/nri1436.
55. De Groot A, Baker M, Cohen T. Species neutral correlates of immunogenicity for vaccines and protein therapeutics: fact or science fiction. *Human Vaccines*. 2010; 6: p. 371-372. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2943984/>.
56. Chung N, Chen Y, Chan V, Tam P, Lin C. Dendritic cells: sentinels against pathogens. *Histology and Histopathology*. 2004; 19: p. 317-324. doi: 10.14670/HH-19.317.
57. Hasegawa H, Matsumoto T. Mechanisms of Tolerance Induction by Dendritic Cells In Vivo. *Frontiers of Immunology*. 2018; 9. doi: 10.3389/fimmu.2018.00350.
58. Qian C, Cao X. Dendritic cells in the regulation of immunity and inflammation. *Seminars in Immunology*. 2018; 35: p. 3-11. doi: 10.1016/j.smim.2017.12.002.
59. Kubach J, Becker C, Schmitt E, Steinbrink K, Huter E, Tuettenberg A, et al. Dendritic cells: sentinels of immunity and tolerance. *International Journal of Hematology*. 2005; 81: p. 197-203. doi: 10.1532/IJH97.04165.

60. Weber C, Mehta P, Ardito M, Moise L, Martin B, De Groot A. T cell epitope: friend or foe? Immunogenicity of biologics in context. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2009; 61: p. 965-976. doi: 10.1016/j.addr.2009.07.001.
61. Tourdot S, Hickling T. Nonclinical immunogenicity risk assessment of therapeutic proteins. *Bioanalysis*. 2019; 11: p. 1631-1643. doi: 10.4155/bio-2018-0246.
62. Jawa V, Terry F, Gokemeijer J, Mitra-Kaushik S, Roberts B, Tourdot S, et al. T-Cell Dependent Immunogenicity of Protein Therapeutics Pre-clinical Assessment and Mitigation-Updated Consensus and Review 2020. *Frontiers in Immunology*. 2020; 11. doi: 10.3389/fimmu.2020.01301.
63. Barbosa M. Immunogenicity of biotherapeutics in the context of developing biosimilars and biobetters. *Drug Discovery Today*. 2011; 16: p. 345-353. doi: 10.1016/j.drudis.2011.01.011.
64. Groell F, Jordan O, Borchard G. In vitro models for immunogenicity prediction of therapeutic proteins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2018; 130: p. 128-142. doi: 10.1016/j.ejpb.2018.06.008.
65. De Groot A, Martin W. Reducing risk, improving outcomes: bioengineering less immunogenic protein therapeutics. *Clinical Immunology*. 2009; 131: p. 189-201. doi: 10.1016/j.clim.2009.01.009.
66. Gokemeijer J, Jawa V, Mitra-Kaushik S. How Close Are We to Profiling Immunogenicity Risk Using In Silico Algorithms and In Vitro Methods?: an Industry Perspective. *The AAPS Journal*. 2017; 19: p. 1587-1592. doi: 10.1208/s12248-017-0143-z.
67. Conant S, Swanborg R. MHC class II peptide flanking residues of exogenous antigens influence recognition by autoreactive T cells. *Autoimmunity Reviews*. 2003; 2: p. 8-12. doi: 10.1016/s1568-9972(02)00102-7.
68. O'Brien C, Flower D, Feighery C. Peptide length significantly influences in vitro affinity for MHC class II molecules. *Immunome Research*. 2008; 4. doi: 10.1186/1745-7580-4-6.
69. Peters B, Nielsen M, Sette A. T Cell Epitope Predictions. *Annual Review of Immunology*. 2020; 38: p. 123-145. doi: 10.1146/annurev-immunol-082119-124838.
70. Southwood S, Sidney J, Kondo A, del Guercio M, Appella E, Hoffman S, et al. Several common HLA-DR types share largely overlapping peptide binding repertoires. *Journal of Immunology*. 1998; 160: p. 3363-3373. <https://journals.aai.org/jimmunol/article/160/7/3363/31365>.
71. Gfeller D, Bassani-Sternberg M. Predicting Antigen Presentation-What Could We Learn From a Million Peptides? *Frontiers in Immunology*. 2018; 9. doi: 10.3389/fimmu.2018.01716.

72. Wullner D, Zhou L, Bramhall E, Kuck A, Goletz T, Swanson S, et al. Considerations for optimization and validation of an in vitro PBMC derived T cell assay for immunogenicity prediction of biotherapeutics. *Clinical Immunology*. 2010; 137: p. 5-14. doi: 10.1016/j.clim.2010.06.018.
73. Jaber A, Baker M. Assessment of the immunogenicity of different interferon beta-1a formulations using ex vivo T-cell assays. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2007; 43: p. 1256-1261. doi: 10.1016/j.jpba.2006.10.023.
74. Liechti T, Roederer M. OMIP-060: 30-Parameter Flow Cytometry Panel to Assess T Cell Effector Functions and Regulatory T Cells. *Cytometry*. 2019; 95: p. 1129-1134. doi: 10.1002/cyto.a.23853.
75. Poloni C, Schonhofer C, Ivison S, Levings M, Steiner T, Cook L. T-cell activation-induced marker assays in health and disease. *Immunology and Cell Biology*. 2023; 101: p. 491-503. doi: 10.1111/imcb.12636.
76. Hermeling S, Jiskoot W, Crommelin D, Bornaes C, Schellekens H. Development of a transgenic mouse model immune tolerant for human interferon Beta. *Pharmaceutical Research*. 2005; 22: p. 847-851. doi: 10.1007/s11095-005-4578-z.
77. van Beers M, Sauerborn M, Gilli F, Hermeling S, Brinks V, Schellekens H, et al. Hybrid transgenic immune tolerant mouse model for assessing the breaking of B cell tolerance by human interferon beta. *Journal of Immunological Methods*. 2010; 352: p. 32-7. doi: 10.1016/j.jim.2009.10.005.
78. Bessa J, Boeckle S, Beck H, Buckel T, Schlicht S, Ebeling M, et al. The immunogenicity of antibody aggregates in a novel transgenic mouse model. *Pharmaceutical Research*. 2015; 32: p. 2344-2359. doi: 10.1007/s11095-015-1627-0.
79. Filipe V, Jiskoot W, Basmeleh A, Halim A, Schellekens H, Brinks V. Immunogenicity of different stressed IgG monoclonal antibody formulations in immune tolerant transgenic mice. *MAbs*. 2012; 4: p. 740-752. doi: 10.4161/mabs.22066.
80. Lenk C, Unterthurner S, Schuster M, Weiller M, Antoine G, Malisauskas M, et al. Development of a transgenic mouse model with immune tolerance for human coagulation factor VIIa. *Pharmaceutical Research*. 2013; 30: p. 2855-2867. doi: 10.1007/s11095-013-1115-3.
81. Jiskoot W, Kijanka G, Randolph T, Carpenter J, Koulov A, Mahler H, et al. Mouse Models for Assessing Protein Immunogenicity: Lessons and Challenges. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016; 105: p. 1567-1575. doi: 10.1016/j.xphs.2016.02.031.
82. Taneja V, David C. HLA transgenic mice as humanized mouse models of disease and immunity. *Journal of Clinical Investigation*. 1998; 101: p. 921-926. doi: 10.1172/JCI2860.

83. Taneja V, David C. HLA class II transgenic mice as models of human diseases. *Immunological Reviews*. 1999; 169: p. 67-79. doi: 10.1111/j.1600-065x.1999.tb01307.x.
84. Hoffmann S, Cepok S, Grummel V, Lehmann-Horn K, Hackermüller J, Stadler P, et al. HLA-DRB1*0401 and HLA-DRB1*0408 are strongly associated with the development of antibodies against interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *American Journal of Human Genetics*. 2008; 83: p. 219-227. doi: 10.1016/j.ajhg.2008.07.006.
85. Abraham R, David C. Identification of HLA-class-II-restricted epitopes of autoantigens in transgenic mice. *Current Opinion in Immunology*. 2000; 12: p. 122-129. doi: 10.1016/s0952-7915(99)00060-6.
86. Moise L, Song C, Martin W, Tassone R, De Groot A, Scott D. Effect of HLA DR epitope de-immunization of Factor VIII in vitro and in vivo. *Clinical Immunology*. 2012; 142: p. 320-331. doi: 10.1016/j.clim.2011.11.010.
87. De Groot A. Immunomics: discovering new targets for vaccines and therapeutics. *Drug Discovery Today*. 2006; 11: p. 203-209. doi: 10.1016/S1359-6446(05)03720-7.
88. Ricotti S, Garay A, Etcheverrigaray M, Amadeo G, De Groot A, Martin W, et al. Development of IFN β -1a versions with reduced immunogenicity and full in vitro biological activity for the treatment of multiple sclerosis. *Clinical Immunology*. 2023; 257: p. 1-11. doi: 10.1016/j.clim.2023.109831.
89. Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*. 2002; 30: p. 3059-3066. doi: 10.1093/nar/gkf436.
90. Leaver-Fay A, Tyka M, Lewis S, Lange O, Thompson J, Jacak R, et al. ROSETTA3: an object-oriented software suite for the simulation and design of macromolecules. *Methods in Enzymology*. 2011; 487: p. 545-574. doi: 10.1016/B978-0-12-381270-4.00019-6.
91. Alford R, Leaver-Fay A, Jeliazkov J, O'Meara M, DiMaio F, Park H, et al. The Rosetta All-Atom Energy Function for Macromolecular Modeling and Design. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2017; 13: p. 3031-3048. doi: 10.1021/acs.jctc.7b00125.
92. Barlow K, Ó Conchúir S, Thompson S, Suresh P, Lucas J, Heinonen M, et al. Flex ddG: Rosetta Ensemble-Based Estimation of Changes in Protein-Protein Binding Affinity upon Mutation. *The Journal of Physical Chemistry*. 2018; 122: p. 5389-5399. doi: 10.1021/acs.jpcc.7b11367.
93. Graham F, Smiley J, Russell W, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *Journal of General Virology*. 1977; 36: p. 59-74. doi: 10.1099/0022-1317-36-1-59.

94. Puck T, Cieciura S, Robinson A. Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *Journal of Experimental Medicine*. 1958; 108: p. 945-956. doi: 10.1084/jem.108.6.945.
95. Hayflick L. The establishment of a line (WISH) of human amnion cells in continuous cultivation. *Experimental Cell Research*. 1961; 23: p. 14-20. doi: 10.1016/0014-4827(61)90059-3.
96. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
97. Freshney R. *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications* EE.UU: Wiley-Liss Inc; 2000.
98. Cook J, Mitchell J. Viability measurements in mammalian cell systems. *Analytical Biochemistry*. 1989; 179: p. 1-7. doi: 10.1016/0003-2697(89)90191-7.
99. Hay R. *Animal cell culture. A practical approach* Oxford: IRL Press; 1986.
100. Lovelock J, Bishop M. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulfoxide. *Nature*. 1959; 183: p. 1394-1395. doi: 10.1038/1831394a0.
101. Leibo S, Mazur P. The role of cooling rates in low-temperature preservation. *Cryobiology*. 1971; 8: p. 447-452. doi: 10.1016/0011-2240(71)90035-6.
102. Greene A, Athreya B, Lehr H, Coriell L. Viability of cell cultures following extended preservation in liquid nitrogen. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1967; 124: p. 1302-1307. doi: 10.3181/00379727-124-31992.
103. Baltimore D. The strategy of RNA viruses. *Harvey Lectures*. 1974; 70: p. 57-74.
104. Esposito D, Craigie R. HIV integrase structure and function. *Advances in Virus Research*. 1999; 52: p. 319-333. doi: 10.1016/s0065-3527(08)60304-8.
105. Sakuma T, Barry M, Ikeda Y. Lentiviral vectors: basic to translational. *The Biochemical Journal*. 2012; 443: p. 603-618. doi: 10.1042/BJ20120146.
106. Milano F. *Diseño y validación de bioensayos para la valoración biológica in vitro de fármacos*. Tesina de grado, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL. Santa Fe, Argentina, 2001.
107. Knight E, Fahey D. Human fibroblast interferon. An improved purification. *Journal of Biological Chemistry*. 1981; 256: p. 3609-3611. [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(19\)69491-3/pdf](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(19)69491-3/pdf).

108. Friesen H, Stein S, Evinger M, Familletti P, Familletti J, Meienhofer J, et al. Purification and molecular characterization of human fibroblast interferon. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1981; 206: p. 432-450. doi: 10.1016/0003-9861(81)90111-9.
109. Ceaglio N, Etcheverrigaray M, Kratje R, Oggero M. Novel long-lasting interferon alpha derivatives designed by glycoengineering. *Biochimie*. 2008; 90: p. 437-449. doi: 10.1016/j.biochi.2007.10.013.
110. Mufarrege E, Giorgetti S, Etcheverrigaray M, Terry F, Martin W, De Groot A. De-immunized and Functional Therapeutic (DeFT) versions of a long lasting recombinant alpha interferon for antiviral therapy. *Clinical Immunology*. 2017; 176: p. 31-41. doi: 10.1016/j.clim.2017.01.003.
111. Song K, Yoon I, Kim N, Kim D, Lee J, Lee H, et al. Glycoengineering of interferon- β 1a improves its biophysical and pharmacokinetic properties. *PLoS One*. 2014; 9: p. e96967. doi: 10.1371/journal.pone.0096967.
112. Rodriguez J, Spearman M, Tharmalingam T, Sunley K, Lodewyckx C, Huzel N, et al. High productivity of human recombinant beta-interferon from a low-temperature perfusion culture. *Journal of Biotechnology*. 2010; 150: p. 509-518. doi: 10.1016/j.jbiotec.2010.09.959.
113. Laemmli U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227: p. 680-685. doi: 10.1038/227680a0.
114. Mufarrege E, Haile L, Etcheverrigaray M, Verthelyi D. Multiplexed Gene Expression as a Characterization of Bioactivity for Interferon Beta (IFN- β) Biosimilar Candidates: Impact of Innate Immune Response Modulating Impurities (IIRMI). *The AAPS Journal*. 2019; 21: p. 1-11. doi: 10.1208/s12248-019-0300-7.
115. Rubinstein S, Familletti P, Pestka S. Convenient assay for interferons. *Journal of Virology*. 1981; 37: p. 755-758. doi: 10.1128/JVI.37.2.755-758.1981.
116. Oyama T, Suzuki S, Horiguchi Y, Yamane A, Akao K, Nagamori K, et al. Performance Comparison of Spectral Distance Calculation Methods. *Applied Spectroscopy*. 2022; 76: p. 1482-1493. doi: 10.1177/00037028221121687.
117. Mamedov A, Vorobyeva N, Filimonova I, Zakharova M, Zakharova I, Bashinskaya V, et al. Protective Allele for Multiple Sclerosis HLA-DRB1*01:01 Provides Kinetic Discrimination of Myelin and Exogenous Antigenic Peptides. *Frontiers in Immunology*. 2020; 10: p. 1-13. doi: 10.3389/fimmu.2019.03088.
118. Ackerman S, Douglas S. Purification of human monocytes on microexudate-coated surfaces. *Journal of Immunology*. 1978; 120: p. 1372-1374. <https://journals.aai.org/jimmunol/article-abstract/120/4/1372/10627/Purification-of-Human-Monocytes-on>.

119. Hojati Z, Kay M, Dehghanian F. Mechanim of Action of Interferon Beta in Treatment of Multiple Sclerosis. En Multiple Sclerosis.: Elsevier Inc; 2016. p. 365–392.
120. Gilli F, Marnetto F, Caldano M, Sala A, Malucchi S, Di Sapio A, et al. Biological responsiveness to first injections of interferon-beta in patients with multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*. 2005; 158: p. 195-203. doi: 10.1016/j.jneuroim.2004.08.006.
121. Malucchi S, Sala A, Gilli F, Bottero R, Di Sapio A, Capobianco M, et al. Neutralizing antibodies reduce the efficacy of beta1FN during treatment of multiple sclerosis. *Neurology*. 2004; 62: p. 2031-2037. doi: 10.1212/01.wnl.0000129265.73259.9e.
122. Sorensen P, Ross C, Clemmesen K, Bendtzen K, Frederiksen J, Jensen K, et al. Clinical importance of neutralising antibodies against interferon beta in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet*. 2003; 362: p. 1184-1191. doi: 10.1016/S0140-6736(03)14541-2.
123. Stickler M, Valdes A, Gebel W, Razo O, Faravashi N, Chin R, et al. The HLA-DR2 haplotype is associated with an increased proliferative response to the immunodominant CD4(+) T-cell epitope in human interferon-beta. *Genes and Immunity*. 2004; 5: p. 1-7. doi: 10.1038/sj.gene.6364027.
124. Kalluri S, Grummel V, Hracsko Z, Pongratz V, Pernpeintner V, Gasperi C, et al. Interferon-beta specific T cells are associated with the development of neutralizing antibodies in interferon-beta treated multiple sclerosis patients. *Journal of Autoimmunity*. 2018; 88: p. 83-90. doi: 10.1016/j.jaut.2017.10.003.
125. Dingman R, Balu-Iyer S. Immunogenicity of Protein Pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019; 108: p. 1637-1654. doi: 10.1016/j.xphs.2018.12.014.
126. De Groot A, McMurry J, Moise L. Prediction of immunogenicity: in silico paradigms, ex vivo and in vivo correlates. *Current Opinion in Pharmacology*. 2008; 8: p. 620-626. doi: 10.1016/j.coph.2008.08.002.
127. Pineda C, Castañeda Hernández G, Jacobs I, Alvarez D, Carini C. Assessing the Immunogenicity of Biopharmaceuticals. *BioDrugs*. 2016; 30: p. 195-206. doi: 10.1007/s40259-016-0174-5.
128. Immunogenicity Assessment for Therapeutic Protein Products. US Food and Drug Administration. 2014.
129. Guideline on Immunogenicity assessment of therapeutic proteins. European Medicines Agency. 2017.

130. Haile L, Polumuri S, Rao R, Kelley-Baker L, Kryndushkin D, Rajaiah R, et al. Cell based assay identifies TLR2 and TLR4 stimulating impurities in Interferon beta. *Scientific Reports*. 2017; 7: p. 1-11. doi: 10.1038/s41598-017-09981-w.
131. Konrad M, Childs A, Merigan T, Borden E. Assessment of the antigenic response in humans to a recombinant mutant interferon beta. *Journal of Clinical Immunology*. 1987; 7: p. 365-375. doi: 10.1007/BF00917014.
132. Larocca A, Leung S, Marcus S, Colby C, Borden E. Evaluation of neutralizing antibodies in patients treated with recombinant interferon-beta ser. *Journal of Interferon Research*. 1989; 9: p. 51-60. <https://europepmc.org/article/med/2809278>.
133. Buck D, Andlauer T, Igl W, Wicklein E, Mühlau M, Weber F, et al. Effect of HLA-DRB1 alleles and genetic variants on the development of neutralizing antibodies to interferon beta in the BEYOND and BENEFIT trials. *Multiple Sclerosis*. 2019; 25: p. 565-573. doi: 10.1177/1352458518763089.
134. Cousens L, Najafian N, Martin W, De Groot A. Tregitope: Immunomodulation powerhouse. *Human Immunology*. 2014; 75: p. 1139-1146. doi: 10.1016/j.humimm.2014.10.012.
135. Crommelin D, Sindelar R, Meibohm B. *Pharmaceutical Biotechnology* Cham: Springer International Publishing; 2019.
136. Bleck G. GPEX® A Flexible Method for the Rapid Generation of Stable, High Expressing, Antibody Producing Mammalian Cell Lines. En *Biotechnology: Pharmaceutical Aspects*. New York: Springer; 2010. p. 51-62.
137. Barbosa M, Vielmetter J, Chu S, Smith D, Jacinto J. Clinical link between MHC class II haplotype and interferon-beta (IFN-beta) immunogenicity. *Clinical Immunology*. 2006; 118: p. 42-50. doi: 10.1016/j.clim.2005.08.017.
138. Mastrangeli R, Rossi M, Mascia M, Palinsky W, Datola A, Terlizese M, et al. In vitro biological characterization of IFN- β -1a major glycoforms. *Glycobiology*. 2015; 25: p. 21-29. doi: 10.1093/glycob/cwu082.
139. Kasama K, Utsumi J, Matsuo-Ogawa E, Nagahata T, Kagawa Y, Yamazaki S, et al. Pharmacokinetics and biologic activities of human native and asialo-interferon-beta s. *Journal of Interferon and Cytokine Research*. 1995; 15: p. 407-415. doi: 10.1089/jir.1995.15.407.
140. Barbosa M, Celis E. Immunogenicity of protein therapeutics and the interplay between tolerance and antibody responses. *Drug Discovery Today*. 2007; 12: p. 674-681. doi: 10.1016/j.drudis.2007.06.005.
141. Esnault S, Benbernou N, Lavaud F, Shin H, Potron G, Guenounou M. Differential spontaneous expression of mRNA for IL-4, IL-10, IL-13, IL-2 and interferon-gamma (IFN-

- gamma) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from atopic patients. *Clinical and Experimental Immunology*. 1996; 103: p. 111-118. doi: 10.1046/j.1365-2249.1996.00911.x.
142. Maggi E, Parronchi P, Manetti R, Simonelli C, Piccinni M, Rugiu F, et al. Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *Journal of Immunology*. 1992; 148: p. 2142-2147. <https://journals.aai.org/jimmunol/article-abstract/148/7/2142/25273/Reciprocal-regulatory-effects-of-IFN-gamma-and-IL-4>.
 143. Golubovskaya V, Wu L. Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers (Basel)*. 2016; 8: p. 1-12. doi: 10.3390/cancers8030036.
 144. Gorabi A, Hajighasemi S, Kiaie N, Gheibi Hayat S, Jamialahmadi T, Johnston T, et al. The pivotal role of CD69 in autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*. 2020; 111: p. 1-11. doi: 10.1016/j.jaut.2020.102548.
 145. Lai J, Luo S, Ho L. Targeting the CD40-CD154 Signaling Pathway for Treatment of Autoimmune Arthritis. *Cells*. 2019; 8: p. 1-18. doi: 10.3390/cells8080927.
 146. Chattopadhyay P, Yu J, Roederer M. A live-cell assay to detect antigen-specific CD4+ T cells with diverse cytokine profiles. *Nature Medicine*. 2005; 11: p. 1113-1117. doi: 10.1038/nm1293.
 147. Piatek P, Namiecinska M, Domowicz M, Wieczorek M, Michlewska S, Matysiak M, et al. Multiple Sclerosis CD49d+CD154+ As Myelin-Specific Lymphocytes Induced During Remyelination. *Cells*. 2019; 9: p. 1-18. doi: 10.3390/cells9010015.
 148. Hewitson J, Jenkins G, Hamblin P, Mountford A. CD40/CD154 interactions are required for the optimal maturation of skin-derived APCs and the induction of helminth-specific IFN-gamma but not IL-4. *Journal of Immunology*. 2006; 177: p. 3209-3217. doi: 10.4049/jimmunol.177.5.3209.
 149. Wong H, Prasad A, Gan S, Chua J, Schwarz H. Identification of CD137-Expressing B Cells in Multiple Sclerosis Which Secrete IL-6 Upon Engagement by CD137 Ligand. *Frontiers in Immunology*. 2020; 11: p. 1-11. doi: 10.3389/fimmu.2020.571964.
 150. Sauna Z, Lagassé D, Pedras-Vasconcelos J, Golding B, Rosenberg A. Evaluating and Mitigating the Immunogenicity of Therapeutic Proteins. *Trends in Biotechnology*. 2018; 36: p. 1068-1084. doi: 10.1016/j.tibtech.2018.05.008.

