

Universidad Nacional del Litoral
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Laboratorio de Cultivos Celulares

DESARROLLO DE UNA TECNOLOGÍA DE PRODUCCIÓN
DE INTERFERÓN ALFA HUMANO RECOMBINANTE
GLICOSILADO EN CÉLULAS EUKARIONTES

Tesista: Lic. Natalia Analía Ceaglio

Co-Director: Dr. Marcos Oggero

Director: Dr. Ricardo Kratje

INTRODUCCIÓN

MATERIALES Y MÉTODOS

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aunque a veces parecía inalcanzable, finalmente he arribado al término de esta etapa. Son muchas las personas que me han acompañado en ella y a las cuales les debo un enorme agradecimiento...

A Marina y Ricardo, por haberme permitido ser parte de este laboratorio y por brindarme su inmediata confianza y un abanico de oportunidades. Por sus consejos, su experiencia y su preocupación no sólo en el ámbito profesional sino también personal.

A Marcos, por ser un guía constante y, principalmente, paciente. Por su invaluable aporte a este trabajo.

Quiero darles muchísimas gracias a mis compañeros: Romina, Guillermina, Norma, Matías, Claudio, Nacho y Fede, no sólo por sus sugerencias e ideas sobre mi Tesis, sino por crear un ambiente de trabajo maravilloso. Este camino habría sido más dificultoso sin las charlas y discusiones del mediodía, los mates (por cierto, a toda hora) y los momentos compartidos.

También quiero incluir a Lucía, Andrea G., Dulcinea, Andrea V., Virginia, por su calidez, su ayuda y por "otra tanda de mates". A Mary, por sus "mimos" matutinos. A Pancho, por su socorro frente a mis inconvenientes informáticos. A Romina P., gracias por su "cancha" en los ensayos de actividad biológica. A Sebastián R., por su colaboración en este trabajo.

Al resto del equipo del laboratorio que me ha acompañado durante estos años... hoy somos tantos que no quiero arriesgarme a nombrarlos sin olvidarme de nadie. Deseo que todos se sientan incluidos en este agradecimiento, ya que de una forma u otra han contribuido con su predisposición y buena voluntad a que hoy me encuentre con el ejemplar de Tesis en la mano.

A mis padres, hermanas, cuñados y sobrinos. Gracias por apoyarme incondicionalmente, aunque todavía intenten descifrar bien a qué me dedico... A mi familia "política", por escuchar atentamente mis relatos y alentarme a continuar...

A mis amigas, por seguir acompañándome en este laberinto que es la vida. A mis amigas "biotecnólogas" porque siempre puedo acudir a ellas.

A Nicolás, mi compañero de vida, simplemente gracias por estar. Por escucharme, por entenderme y por alegrarte conmigo cada vez que avanzo un paso en este sinuoso camino que es el trabajo de investigación.

ÍNDICE

Abreviaturas, siglas y símbolos	viii
Unidades	xii
Resumen	xiii
Summary	xv
Introducción	1
1. Las citoquinas como agentes terapéuticos	2
2. Interferones	4
2.1. Clasificación y nomenclatura de los interferones	4
2.2. Genes y proteínas de los interferones de tipo I	5
2.3. Inducción, producción y mecanismo de acción de los interferones de tipo I	5
2.3.1. Inductores de la síntesis de interferón	6
2.3.2. Receptores de interferón	6
2.3.3. Transducción de la señal	7
2.4. Acciones biológicas de los interferones de tipo I	7
2.4.1. Actividad antiviral	7
2.4.2. Actividad antiproliferativa y antitumoral	9
2.4.3. Actividad inmunomoduladora	10
3. Interferón- α	11
3.1. Subtipos de IFN- α	11
3.2. Estructura del IFN- α 2	12
3.3. Región molecular de unión al receptor del IFN- α 2	14
3.4. Interferón- α 2 recombinante	16
3.4.1. Usos clínicos del rhIFN- α 2	17
3.4.2. Efectos adversos del rhIFN- α 2	17
4. Glicosilación de proteínas	18
4.1. Tipos de glicosilación y estructura de los oligosacáridos	18
4.1.1. Glicosilación de tipo N	18
4.1.2. Glicosilación de tipo O	19
4.2. Rol biológico de los oligosacáridos de glicoproteínas	19
4.2.1. Efectos sobre la solubilidad y estabilidad	20
4.2.2. Efectos sobre la actividad biológica	20
4.2.3. Efectos sobre la antigenicidad e inmunogenicidad	20
4.2.4. Efectos sobre la farmacocinética y <i>clearance in vivo</i>	21
4.3. Factores que afectan la eficiencia de <i>N</i> -glicosilación de proteínas	21

4.4.	Producción de glicoproteínas recombinantes en células de mamífero	22
5.	Estrategias para disminuir el <i>clearance</i> de proteínas terapéuticas	23
5.1.	Modificaciones químicas	24
5.1.1.	Adición covalente de polietilenglicol (Pegilación)	24
5.1.2.	Conjugación con otros polímeros biodegradables	24
5.1.3.	<i>Cross-linking</i> de proteínas	25
5.2.	Modificaciones genéticas	25
5.2.1.	Fusión de proteínas	25
5.2.2.	Glicoingeniería	25
Objetivos y plan de tesis		27
Materiales y Métodos		29
1.	Reactivos y soluciones	30
2.	Líneas celulares, cepas bacterianas y cepas virales	30
3.	Medios de cultivo	31
3.1.	Medios de cultivo para células eucariotas	31
3.2.	Medios de cultivo para células procariotas	32
4.	Sistemas de cultivo de células	33
5.	Determinación de la concentración de células viables, muertas y totales	33
6.	Criopreservación de líneas celulares de mamífero	34
7.	Criopreservación de cepas bacterianas	34
8.	Revitalización de líneas celulares de mamífero	35
9.	Revitalización de cepas bacterianas	35
10.	Métodos de cuantificación del rhIFN- α 2b	35
10.1.	Desarrollo de diferentes ELISAs	35
10.1.1.	ELISA <i>sandwich</i>	35
10.1.2.	ELISA de competición	37
10.1.3.	Evaluación de diferentes entornos proteicos (efecto matriz)	38
10.2.	Cromatografía en fase reversa	39
10.3.	Espectrofotometría	39
11.	Métodos de valoración de la actividad biológica <i>in vitro</i> del rhIFN- α 2b	40
11.1.	Valoración de la actividad biológica antiviral	40
11.2.	Valoración de la actividad biológica antiproliferativa	42
12.	Métodos de identificación y análisis de glicoformas del rhIFN- α 2b y sus variantes mutadas	43
12.1.	Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y <i>Western blot</i>	43
12.2.	Isoelectroenfoque	45
13.	Construcción de vectores para expresión en eucariotas conteniendo el gen del rhIFN- α 2b y sus variantes mutadas	45
13.1.	Técnicas de biología molecular para clonado	45
13.1.1.	Preparación de ADN plasmídico	45

13.1.2.	Digestiones enzimáticas	47
13.1.3.	Electroforesis en geles de agarosa	47
13.1.4.	Purificación de fragmentos de ADN	47
13.1.5.	Reacciones de ligación de ADN	48
13.1.6.	Preparación de células de <i>Escherichia coli</i> DH5 α F'lq competentes	48
13.1.7.	Transformación de células competentes	49
13.2.	Aislamiento de la región codificante del hIFN- α 2b	49
13.3.	Clonado del gen del hIFN- α 2b en el plásmido pGEM [®] -T Easy	50
13.4.	Subclonado del gen del hIFN- α 2b en el vector de expresión pCI-neo	51
13.5.	Mutagénesis sitio dirigida del rhIFN- α 2b	52
13.6.	Clonado de los genes de las muteínas del rhIFN- α 2b en el vector de expresión pCI-neo	54
13.7.	Construcción de muteínas del rhIFN- α 2b con un número variable de sitios susceptibles de <i>N</i> -glicosilación	56
14.	Transfecciones de células eucariotas	56
14.1.	Transfecciones transitorias de células CHO.K1 para el análisis del rhIFN- α 2b y sus variantes mutadas	57
14.2.	Obtención de líneas celulares estables productoras del rhIFN- α 2b y sus variantes mutadas	57
15.	Clonado de líneas celulares productoras del rhIFN- α 2b y sus muteínas	58
16.	Producción del rhIFN- α 2b y sus muteínas mediante el cultivo de clones en condiciones de adherencia	59
17.	Purificación del rhIFN- α 2b y sus variantes glicosiladas a partir de sobrenadantes de cultivo por cromatografía de inmunoafinidad	60
17.1.	Material de partida	60
17.2.	Equipamiento	61
17.3.	Parámetros evaluadores de la <i>performance</i> de la purificación	61
17.4.	Preparación de las matrices de inmunoafinidad	61
17.4.1.	Amplificación de hibridomas productores de mAbs anti-rhIFN- α 2b. Producción <i>in vivo</i> en líquido ascítico	61
17.4.2.	Cuantificación del ligando de afinidad	62
17.4.3.	Purificación del ligando de afinidad	63
17.4.4.	Inmovilización del ligando de afinidad	64
17.5.	Protocolos de purificación del rhIFN- α 2b y sus variantes glicosiladas por cromatografía de inmunoafinidad	64
17.5.1.	Protocolo para evaluar la <i>performance</i> de los diferentes mAbs	64
17.5.2.	Evaluación de diferentes condiciones de elución para la resina CA5E6- <i>Sepharose</i>	65
17.5.3.	Protocolo final de purificación empleando la resina CA5E6- <i>Sepharose</i>	66
17.6.	Concentración y diafiltración de la proteína	66

17.7.	Determinación de la concentración de proteínas totales	67
17.8.	Determinación de la pureza mediante técnica de SDS-PAGE con posterior tinción argéntica	67
18.	Evaluación de la farmacocinética de las variantes del rhIFN- α 2b en animales de experimentación	67
18.1.	Vía de inoculación endovenosa	68
18.2.	Vía de inoculación subcutánea	72
18.3.	Estimación de parámetros farmacocinéticos mediante el método de los residuales	75
18.3.1.	Cálculo de parámetros farmacocinéticos para una droga que sigue un modelo de dos compartimientos luego de su inyección por vía endovenosa	75
18.3.2.	Cálculo de parámetros farmacocinéticos para una droga que sigue un modelo de un compartimiento luego de su inyección por vía subcutánea	76
19.	Caracterización de la muteína con cuatro sitios de <i>N</i> -glicosilación (rhIFN- α 2b4N)	77
19.1.	Evaluación de la actividad biológica antitumoral <i>in vivo</i> del rhIFN- α 2b4N en animales de experimentación	77
19.2.	Evaluación de la estabilidad del rhIFN- α 2b4N en plasma de rata	78
19.3.	Evaluación de la estabilidad del rhIFN- α 2b4N frente a la acción de proteasas específicas	78
Resultados y Discusión		80
1.	Desarrollo de métodos de cuantificación del rhIFN- α 2b	81
1.1.	Enzimoimmunoensayos (ELISAs)	81
1.1.1.	ELISA <i>sandwich</i>	81
1.1.1.1.	Selección de mAbs de captura	82
1.1.1.2.	Análisis de diferentes entornos proteicos (efecto matriz)	84
1.1.2.	ELISA de competición	86
1.1.2.1.	Selección de mAbs de competición	87
1.1.3.	Validación de los inmunoensayos y evaluación de la reproducibilidad intra- e inter-ensayo	89
1.2.	Cromatografía en fase reversa	91
2.	Desarrollo de ensayos de valoración biológica <i>in vitro</i> del rhIFN- α 2b	93
2.1.	Ensayo de valoración de la actividad biológica antiviral del rhIFN- α 2b	93
2.1.1.	Optimización de un ensayo de valoración biológica antiviral	93
2.1.2.	Valoración biológica antiviral	96
2.2.	Ensayo de valoración de la actividad biológica antiproliferativa del rhIFN- α 2b	97
2.2.1.	Optimización de un ensayo de valoración biológica antiproliferativa	98
2.2.2.	Valoración biológica antiproliferativa	99

3.	Evaluación de los aminoácidos del rhIFN- α 2b <i>wild type</i> a ser modificados con el fin de introducir sitios susceptibles de <i>N</i> -glicosilación	100
4.	Construcción de muteínas del rhIFN- α 2b con un sitio de <i>N</i> -glicosilación	103
4.1.	Aislamiento de la región codificante del hIFN- α 2b	103
4.2.	Clonado del gen del hIFN- α 2b en el plásmido pGEM [®] -T Easy	104
4.3.	Subclonado del gen del hIFN- α 2b en el vector de expresión pCI-neo	105
4.4.	Mutagénesis sitio dirigida del rhIFN- α 2b	106
4.5.	Clonado de los genes de las muteínas del rhIFN- α 2b en el vector de expresión pCI-neo	108
5.	Caracterización de las muteínas del rhIFN- α 2b con un sitio de <i>N</i> -glicosilación	108
5.1.	Transfecciones transitorias de células CHO.K1	108
5.2.	Cuantificación del rhIFN- α 2b <i>wild type</i> y sus muteínas mediante técnica de ELISA <i>sandwich</i>	109
5.3.	Determinación de la actividad biológica específica antiviral y antiproliferativa del rhIFN- α 2b <i>wild type</i> y sus derivados	112
5.4.	Evaluación del grado de glicosilación de las muteínas del rhIFN- α 2b mediante ensayos de <i>Western blot</i>	114
6.	Producción, purificación y caracterización farmacocinética del rhIFN- α 2b <i>wild type</i> y de las variantes con un sitio de <i>N</i> -glicosilación rhIFN- α 2bP4N y rhIFN- α 2bD77N	118
6.1.	Obtención de clones estables de células CHO.K1 productores del rhIFN- α 2b <i>wild type</i> , rhIFN- α 2bP4N y rhIFN- α 2bD77N	118
6.2.	Producción del rhIFN- α 2b <i>wild type</i> , rhIFN- α 2bP4N y rhIFN- α 2bD77N mediante el cultivo de los clones seleccionados en condiciones de adherencia	119
6.3.	Purificación del rhIFN- α 2b <i>wild type</i> y rhIFN- α 2bD77N mediante cromatografía de inmunoafinidad	125
6.3.1.	Preparación de matrices de inmunoafinidad	126
6.3.1.1.	Producción de mAbs <i>in vivo</i> en líquido ascítico	126
6.3.1.2.	Purificación de los mAbs por cromatografía de afinidad a proteína A	126
6.3.1.3.	Acoplamiento de los ligandos de afinidad a una matriz de <i>Sepharose</i> activada con bromuro de cianógeno	128
6.3.2.	Optimización de la purificación del rhIFN- α 2bD77N por cromatografía de inmunoafinidad	129
6.3.2.1.	Evaluación de la <i>performance</i> de los mAbs como ligandos de afinidad	129
6.3.2.2.	Evaluación de diferentes condiciones de elución del rhIFN- α 2b empleando la matriz de inmunoafinidad CA5E6- <i>Sepharose</i>	134
6.3.3.	Purificación del rhIFN- α 2b <i>wild type</i> y del rhIFN- α 2bD77N empleando la resina CA5E6- <i>Sepharose</i> mediante el protocolo optimizado	135

6.4.	Evaluación de la farmacocinética del rhIFN- α 2b no glicosilado, rhIFN- α 2b <i>wild type</i> y rhIFN- α 2bD77N en animales de experimentación	138
7.	Selección de sitios de <i>N</i> -glicosilación para la construcción de muteínas del rhIFN- α 2b hiperglicosiladas	140
8.	Construcción de muteínas del rhIFN- α 2b con un número variable de sitios de <i>N</i> -glicosilación	141
9.	Caracterización de las muteínas del rhIFN- α 2b con un número variable de sitios de <i>N</i> -glicosilación	142
9.1.	Transfecciones transitorias de células CHO.K1	142
9.2.	Cuantificación de las muteínas presentes en los sobrenadantes de cultivo mediante técnica de ELISA <i>sandwich</i> y de ELISA de competición	142
9.3.	Determinación de la actividad biológica específica antiviral y antiproliferativa de las muteínas presentes en los sobrenadantes de cultivo	144
9.4.	Evaluación del grado de glicosilación de las variantes del rhIFN- α 2b mediante ensayos de <i>Western blot</i>	145
10.	Producción, purificación y caracterización farmacocinética de las variantes del rhIFN- α 2b hiperglicosiladas	147
10.1.	Obtención de clones estables de células CHO.K1 productores de rhIFN- α 2b2N, rhIFN- α 2b3N, rhIFN- α 2b4N y rhIFN- α 2b5N	147
10.2.	Producción del rhIFN- α 2b2N, rhIFN- α 2b3N, rhIFN- α 2b4N y rhIFN- α 2b5N mediante el cultivo de los clones seleccionados en condiciones de adherencia	148
10.3.	Purificación del rhIFN- α 2b2N, rhIFN- α 2b3N, rhIFN- α 2b4N y rhIFN- α 2b5N mediante cromatografía de inmovilización de anticuerpos	149
10.4.	Determinación de la concentración de las variantes del rhIFN- α 2b purificadas mediante HPLC en fase reversa	151
10.5.	Análisis de las isoformas de las variantes del rhIFN- α 2b mediante técnica de isoelectroenfoque	155
10.6.	Evaluación de la farmacocinética del rhIFN- α 2b2N, rhIFN- α 2b3N, rhIFN- α 2b4N y rhIFN- α 2b5N en animales de experimentación utilizando la vía subcutánea	157
10.7.	Evaluación de la farmacocinética del rhIFN- α 2b no glicosilado, rhIFN- α 2b1N y rhIFN- α 2b4N en animales de experimentación utilizando la vía endovenosa	161
11.	Estudio de la variante con cuatro sitios de <i>N</i> -glicosilación rhIFN- α 2b4N	164
11.1.	Producción y purificación del rhIFN- α 2b4N a mayor escala	164
11.2.	Evaluación de la actividad biológica antitumoral <i>in vivo</i> del rhIFN- α 2b4N en animales de experimentación	166
11.3.	Evaluación de la estabilidad del rhIFN- α 2b4N en plasma de rata	173
11.4.	Evaluación de la estabilidad del rhIFN- α 2b4N frente a la acción de proteasas específicas	175
11.4.1.	Evaluación de la estabilidad frente a tripsina	175
11.4.2.	Evaluación de la estabilidad frente a elastasa	177

Conclusiones	179
Referencias Bibliográficas	187

ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS

A	Absorbancia
ABAC	Asociación Banco Argentino de Células
ABE	Actividad biológica específica
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
AE	Actividad específica
Ag	Antígeno
Amp ^R	Resistencia a ampicilina
ANOVA	Análisis de la varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ARNdc	Ácido ribonucleico doble cadena
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AS	Ácido siálico
ASA	Área superficial accesible al solvente
AUC	Área bajo la curva
bFGF	Factor de crecimiento fibroblástico básico
BHK	<i>Baby Hamster Kidney</i>
BSA	Seroalbúmina bovina
Cél.	Células
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
C _i	Concentración inicial de células sembradas
CIAP	Fosfatasa alcalina de intestino de ternero
C _f	Concentración final de células luego de la incubación
CL	<i>Clearance</i>
CL _{app}	<i>Clearance</i> aparente
C _{máx}	Concentración plasmática máxima de la droga luego de la administración
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
CMV	Citomegalovirus
CNTF	Factor neurotrópico ciliar
Col.	Colaboradores
C _p	Concentración de la droga en plasma
C _p ^t	Concentración de la droga en plasma a tiempos tardíos
C _p ⁰	Concentración inicial de la droga en plasma
C _{PI}	Concentración de la proteína de interés
C _{PT}	Concentración de proteínas totales
CSF-1	Factor estimulante de colonias 1
C _t	Concentración de la droga en el compartimiento tisular
CV	Coefficiente de variación
dATP	Desoxiadenina trifosfato
D _B	Cantidad de droga en el cuerpo
D _{GI}	Cantidad de droga en el tracto gastrointestinal
D-MEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxinucleótidos
DO	Densidad óptica
D _p	Cantidad de droga en el plasma

D_p^0	Dosis de droga inyectada en el plasma
DSMZ	<i>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH</i>
D_t	Cantidad de droga en el compartimiento tisular
D^0	Dosis de droga administrada
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
ELISA	Enzimoimmunoensayo
EPO	Eritropoyetina
ES-PCR	Extensión por solapamiento mediante PCR
F	Fracción de fármaco absorbida
F%	Biodisponibilidad porcentual
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fig.	Figura
FMS	2-sulfo-9-fluorenilmetoxicarbonilo
FP	Factor de Purificación
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
FSH	Hormona folículo-estimulante
Fuc	Fucosa
Fw	En sentido directo
Gal	Galactosa
GalNAc	<i>N</i> -acetil-galactosamina
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
GI	Tracto gastrointestinal
Glc	Glucosa
GlcNAc	<i>N</i> -acetil-glucosamina
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GPI	Glicosil fosfatidil inositol
Ham's F12	Fórmula 12 de Ham
HBV	Virus de la hepatitis B
HCV	Virus de la hepatitis C
HEPA	Filtro para partículas de aire de alta eficiencia
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
HPLC	Cromatografía líquida de alta <i>performance</i>
IFN	Interferón
IFNs	Interferones
IGFBP-6	Proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina-6
IgG	Inmunoglobulina G
Igs	Inmunoglobulinas
IL	Interleuquina
IPTG	Isopropil- β -D-tio-galactósido
ISGF3	Factor génico estimulado por interferón-3
ISGs	Genes estimulados por interferón
ISRE	Elemento de respuesta estimulado por interferón
Jak1	Proteína kinasa <i>Janus-1</i>
k_a	Constante de velocidad de absorción de primer orden
k_e	Constante de eliminación de primer orden
kpb	Kilopares de bases
k_{10}	Constante de eliminación de la droga hacia el exterior del organismo
k_{12}	Constante de velocidad de transferencia de la droga fuera del torrente sanguíneo
k_{21}	Constante de velocidad de transferencia de la droga dentro del torrente sanguíneo

LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
LCV	Leucemia de células vellosas
LMC	Leucemia mieloide crónica
λ	Longitud de onda
mAb	Anticuerpo monoclonal
Man	Manosa
MDBK	<i>Madin-Darbin Bovine Kidney</i>
MEM	Medio esencial mínimo
M_F	Masa de proteína de interés recuperada en el proceso de purificación
M_I	Masa de proteína de interés sembrada en el proceso de purificación
MMP-9	Metaloproteinasa de matriz-9
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propano sulfónico
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxi-fenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium)
Mx	Proteína de resistencia a myxovirus
n/d	No detectable
Neo ^R	Resistencia a neomicina
NESP	Nueva proteína de estimulación de la eritropoyesis
NIBSC	<i>National Institute for Biological Standards and Control</i>
NK	Células asesinas naturales
NMR	Resonancia magnética nuclear
OAS	2' - 5' oligoadenilato sintetasa
OPD	O-fenilendiamina
ORF	Marco abierto de lectura
OST	Oligosacaril transferasa
P	Promedio
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Solución salina de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PEG	Polietilenglicol
PKR	Proteína quinasa R
PM	Peso molecular
PMS	Metasulfato de fenazina
PNGAsa F	Péptido-N ⁴ -(N-acetil- β -glucosaminil)asparagina amidasa
PVDF	Difluoruro de polivinilo
PVP	Polivinilpirrolidona
R	Recuperación
RE	Retículo endoplasmático
rhIFN- α 2	Interferón- α 2 humano recombinante
RPC	Cromatografía en fase reversa
Rv	En sentido reverso
SD	Desviación estándar
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SEM	Error estándar de la media
SFB	Suero fetal bovino
SPF	Libre de patógenos específicos
STAT	Proteínas transductoras de señales y activadoras de la transcripción
SV40	Virus símico 40
t	Tiempo
TAE	Tris-acetatos-EDTA

TBS	Solución salina de Tris
TE	Tris-EDTA
t_{eff}	Duración de la acción de una droga
TFA	Ácido trifluoroacético
TGF	Factor de crecimiento transformante
$T_{\text{máx}}$	Tiempo para alcanzar la $C_{\text{máx}}$
TNF	Factor de necrosis tumoral
TNFR	Receptor del factor de necrosis tumoral
tPA	Activador del plasminógeno tisular
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminoetano
Tyk2	Tirosín-quinasa-2
$t_{1/2\alpha}$	Tiempo de vida media de distribución de la droga
$t_{1/2\beta}$	Tiempo de vida media de eliminación de la droga
UDP	Uridina-5'-difosfato
UV	Ultravioleta
VC	Volúmenes de columna
V_D	Volumen de distribución
$(V_D)_{\text{SS}}$	Volumen de distribución aparente en el estado estacionario
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
V_p	Volumen del plasma
VSV	Virus de la estomatitis vesicular
V_t	Volumen del compartimiento tisular
X	Concentración de células
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
X_M	Concentración de células muertas
X_T	Concentración de células totales
X_V	Concentración de células vivas

CÓDIGO DE UNA Y TRES LETRAS PARA AMINOÁCIDOS

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

UNIDADES

cm	centímetro
mm	milímetro
µm	micrómetro
nm	nanómetro
cm ²	centímetro cuadrado
kg	kilogramo
g	gramo
mg	miligramo
µg	microgramo
ng	nanogramo
l	litro
ml	mililitro
µl	microlitro
h	hora
min	minuto
s	segundo
M	molar
mM	milimolar
µM	micromolar
nmol	nanomol
UA	unidades arbitrarias
UI	unidades internacionales
kDa	kilodalton
rpm	revoluciones por minuto
mA	miliamperio
V	voltio
W	vatio
% (V/V)	mililitros de solvente en 100 ml de solución
% (P/V)	gramos de soluto en 100 ml de solución
MΩ	mega-ohmio
Å	amstrong
°C	grado Celsius

RESUMEN

El hIFN- α comprende una familia conservada de proteínas que bloquean la infección viral, inhiben la proliferación celular y modulan la diferenciación celular. El rhIFN- α 2b producido en bacterias se encuentra aprobado para su uso clínico en el tratamiento de una amplia variedad de patologías virales y tumorales, como la hepatitis B y C, la leucemia mieloide crónica y el sarcoma de Kaposi, entre otras. El principal problema que reviste el uso clínico de esta citoquina es su rápida eliminación del torrente sanguíneo, lo que demanda la administración de dosis elevadas y frecuentes, con la aparición de efectos colaterales y el deterioro de la calidad de vida del paciente.

En el presente trabajo de Tesis se desarrolló exitosamente una estrategia de glicoingeniería mediante la introducción de sitios potenciales de *N*-glicosilación en la secuencia aminoacídica del rhIFN- α 2b, lo que permitió incrementar la vida media plasmática de la citoquina y, en consecuencia, su actividad biológica *in vivo*.

Un análisis teórico basado en la estructura de la citoquina y en las regiones de la misma potencialmente involucradas en la interacción con el receptor permitió seleccionar 14 mutaciones para generar sitios consenso de *N*-glicosilación con una alta probabilidad de glicosilación, evitando una distorsión estructural y conservando la actividad biológica de la proteína.

Previamente, fue necesario desarrollar métodos confiables para la cuantificación (ELISA *sandwich*, ELISA de competición, HPLC analítico mediante cromatografía en fase reversa), valoración de la actividad biológica *in vitro* (antiviral y antiproliferativa) y análisis de la calidad de los derivados glicosilados del rhIFN- α 2b.

La comparación de la eficiencia de glicosilación y la actividad biológica específica de las muteínas con un sitio de *N*-glicosilación expresadas en forma transitoria en células CHO condujo a la selección de las posiciones más adecuadas para incorporar, de manera secuencial, múltiples sitios de *N*-glicosilación en la molécula de rhIFN- α 2b. De esta manera, se construyó una variante con dos sitios de *N*-glicosilación (rhIFN- α 2b2N), mediante la introducción simultánea de las mutaciones P4N y D77N. Ambas variantes habían demostrado los mayores niveles de *N*-glicosilación (\approx 65% y 70%, respectivamente), conservando intactas ambas funciones biológicas de la citoquina. Posteriormente, se adicionó la mutación R23N para construir una variante con tres sitios de *N*-glicosilación (rhIFN- α 2b3N), dado que, a pesar de su menor actividad antiproliferativa *in vitro*, demostró un alto grado de glicosilación (\approx 55%). La muteína con cuatro sitios de *N*-glicosilación (rhIFN- α 2b4N) se obtuvo mediante la sustitución K70N, mientras que la variante con cinco sitios (rhIFN- α 2b5N) surgió de la sustitución E113N.

Mediante ensayos de *Western blot* se observó un incremento progresivo de la masa molecular de las muteínas conforme al aumento del número de sitios de *N*-glicosilación incorporados. Así, las variantes rhIFN- α 2b4N y rhIFN- α 2b5N alcanzaron una masa molecular máxima de 43 kDa, en comparación con 19 kDa correspondientes a la molécula no glicosilada, sin diferencias apreciables entre ellas. Por otra parte, la actividad biológica específica antiviral de las muteínas disminuyó gradualmente en forma concomitante con la adición de nuevos sitios consenso, conservando la molécula rhIFN- α 2b5N un 10% de la actividad específica correspondiente a la proteína nativa. La introducción de mutaciones o la unión de los

oligosacáridos afectaron en mayor medida a la actividad biológica antiproliferativa de las citoquinas, observándose una notable reducción luego de la sustitución R23N.

La purificación de las citoquinas a partir de sobrenadantes de cultivo de clones estables obtenidos mediante presión selectiva y clonado por dilución límite se llevó a cabo por cromatografía de inmunoafinidad. La evaluación de la *performance* de tres matrices de inmunoafinidad preparadas con mAbs que reconocen diferentes epitopes de la citoquina señaló al mAb CA5E6 como ligando adecuado para la purificación de todas las variantes glicosiladas, obteniéndose una recuperación cercana al 100%, con un elevado factor de purificación (1.298) y una pureza del 85%.

La farmacocinética de todas las variantes del rhIFN- α 2b en ratas inoculadas mediante la vía subcutánea demostró un incremento del tiempo de vida media de absorción y de eliminación y una disminución del *clearance* plasmático en forma concomitante con el agregado de sitios de *N*-glicosilación. De esta manera, el rhIFN- α 2b4N y el rhIFN- α 2b5N exhibieron una vida media 25 veces superior y un *clearance* sistémico 20 veces inferior con respecto a los mismos parámetros de la molécula no modificada. El hecho de que no se observaran diferencias significativas en el comportamiento de ambas moléculas hiperglicosiladas fue consistente con su similar perfil de glicofomas. Por otra parte, la farmacocinética del rhIFN- α 2b4N fue muy similar a la de la variante pegilada rhIFN- α 2b-PEG12kDa, la cual se encuentra aprobada en numerosos países para el tratamiento de diversas enfermedades debido a su superior eficacia terapéutica con respecto a la citoquina no modificada. Utilizando la vía endovenosa se obtuvieron resultados similares.

La actividad biológica antitumoral *in vivo* del rhIFN- α 2b4N fue estudiada en ratones inmunodeficientes mediante la implantación de tumores sólidos de células de origen prostático (PC-3). Se observó que una dosis semanal de $3 \cdot 10^5$ UI de la citoquina hiperglicosilada produjo una disminución de la velocidad de crecimiento de los tumores, en comparación con el mismo esquema de tratamiento con el rhIFN- α 2b no glicosilado. Luego de finalizar el tratamiento, los tumores del grupo tratado con el rhIFN- α 2b4N demostraron un 40% del peso promedio correspondiente al grupo control. Además, en concordancia con la similitud de sus perfiles farmacocinéticos, no se observaron diferencias significativas en el volumen y el peso promedio de los tumores correspondientes a los grupos tratados con rhIFN- α 2b-PEG12kDa y rhIFN- α 2b4N.

En resumen, este trabajo de Tesis permitió desarrollar una estrategia de glicoingeniería que resultó en variantes de rhIFN- α 2b con propiedades farmacocinéticas mejoradas, lo cual se manifestó en un incremento de su eficacia terapéutica *in vivo* en animales de experimentación, permitiendo proyectar la potencialidad de estos derivados para su empleo en salud humana.

SUMMARY

Human alpha interferons (hIFN- α) comprise a family of closely related proteins that block viral infection, inhibit cell proliferation and modulate cell differentiation. Recombinant *E.coli*-derived hIFN- α 2b has been approved for the treatment of a great variety of human viral and tumoral diseases, such as hepatitis B and C, chronic myelogenous leukemia and AIDS-related Kaposi's sarcoma, among others. However, the clinical use of this cytokine has been restricted due to its short circulating half-life, which makes frequent dosing over an extended period necessary, resulting in the development of many adverse effects which deteriorate the patient's life quality.

In the present Thesis work a successful glycoengineering strategy was developed through the introduction of potential *N*-glycosylation sites in the rhIFN- α 2b amino acid sequence, which allowed us to increase the cytokine's plasma half-life and, in turn, its *in vivo* biological activity.

Fourteen mutants were constructed by the insertion of one *N*-glycosylation site consensus sequence into different positions of the cytokine. Mutations were focused on amino acid positions that were believed not to be critical for the protein's structure or function.

Previously, it was necessary to optimize reliable methods for the quantification (sandwich ELISA, competitive ELISA and reverse-phase HPLC) and the *in vitro* determination of the antiviral and antiproliferative biological activities of rhIFN- α 2b.

Taking into account the retained specific *in vitro* bioactivity and the higher carbohydrate content of the rhIFN- α 2b variants transiently expressed in CHO cells, five *N*-glycosylation positions were selected to be introduced into the cytokine. In this way, a mutein with two *N*-glycosylation sites was constructed (rhIFN- α 2b2N) through the simultaneous introduction of P4N and D77N point mutations. Both variants showed the highest *N*-glycosylation levels (\approx 65% y 70%, respectively), while preserving both biological functions of the cytokine. Next, R23N mutation was introduced to construct a variant with three *N*-glycosylation sites (rhIFN- α 2b3N), since that mutein exhibited a high carbohydrate occupancy (\approx 55%) despite its lower *in vitro* antiproliferative activity. The substitution of K70N was used to create a mutein with four *N*-glycosylation sites (rhIFN- α 2b4N), while E113N mutation led to the obtention of a five *N*-glycosylation sites derivative (rhIFN- α 2b5N).

Successive increases in size were observed after each addition of a functional consensus sequence, along with a decrease of less glycosylated isoforms expression, as assessed by Western blot analysis. Particularly, muteins with four and five *N*-glycosylation sites reached a maximum molecular mass of 43 kDa, compared to the 19 kDa corresponding to the non-glycosylated cytokine, without significant differences among them. On the other hand, antiviral biological activity of rhIFN- α 2b was gradually reduced with the incorporation of new glycosylation sites, reaching for the rhIFN- α 2b5N variant approximately a 10-fold lower potency than the corresponding to the wild-type cytokine. The point mutations or the attachment of carbohydrate moieties to the polypeptide affected to a

greater extent the *in vitro* antiproliferative bioactivity, which was drastically reduced after the R23N substitution.

Purification of the rhIFN- α 2b derivatives from culture supernatants of clones obtained by selective pressure was carried out by immunoaffinity chromatography. Three mAbs that recognize spatially distinct epitopes of the cytokine were evaluated as immunoaffinity ligands. mAb CA5E6 was useful to capture all glycosylated analogs, with a high recovery in the elution step (near 100%), and a purity level of 85%, achieving about 1000-fold purification by this single step.

Pharmacokinetic experiments showed a similar behavior of rhIFN- α 2b4N and rhIFN- α 2b5N variants, with a 25-fold increase in the elimination half-life and a 20-fold decrease in the systemic clearance rate compared to the non-glycosylated rhIFN- α 2b following subcutaneous administration to rats. Besides, pharmacokinetics of rhIFN- α 2b4N was very similar to that of the rhIFN- α 2b-PEG12kDa, drug that is approved in many countries for its clinical use due to its higher therapeutic efficacy in comparison with the *E. coli*-derived cytokine. Similar results were obtained after intravenous inoculation.

In vivo antitumoral activity of rhIFN- α 2b4N was studied in immunodeficient mice through the implantation of solid tumors of prostatic PC-3 cells. Treatment with $3 \cdot 10^5$ UI of the hyperglycosylated cytokine once a week led to the reduction of the tumor growth rate in comparison with the same therapy schedule employing the non-glycosylated protein. After 33 days of treatment, the tumors corresponding to the group treated with rhIFN- α 2b4N showed a 40% of the mean weight of the tumors corresponding to the group treated with non-glycosylated rhIFN- α 2b.

In summary, this Thesis was useful to develop a glycoengineering strategy that led to the obtention of rhIFN- α 2b variants with improved pharmacokinetic properties, which, in turn, brought about an increment of the therapeutic efficacy. This allows us to project the potential of the rhIFN- α 2b derivatives for their use in human health.

INTRODUCCIÓN

1. LAS CITOQUINAS COMO AGENTES TERAPÉUTICOS

Las citoquinas son proteínas señalizadoras extracelulares necesarias para la comunicación entre células. Se producen en forma transitoria por la mayoría de los tipos celulares y actúan mediante su unión a un receptor específico de la membrana plasmática, induciendo diferentes caminos de transducción de señales que conducen a la activación de los mecanismos efectores dentro de las células respondedoras. La señalización mediante citoquinas juega un importante rol tanto en condiciones fisiológicas normales como en presencia de patologías. La mayoría de las citoquinas posee actividad pleiotrópica y son esenciales en el desarrollo prenatal y la maduración postnatal, las respuestas inflamatorias e inmunes y el mantenimiento y reparación de los tejidos (Rachmawati y col., 2004).

En condiciones fisiológicas, las citoquinas no están presentes en el organismo en cantidades significativas; sin embargo, son fácilmente inducidas y rápidamente degradadas durante las respuestas inflamatorias e inmunes. Numerosas citoquinas pueden participar en un mismo proceso, una única citoquina puede poseer múltiples funciones y varias citoquinas pueden compartir una misma función. La exposición concurrente de las células a más de una citoquina puede llevar a efectos biológicos aditivos, sinérgicos o antagonistas (Xing y Wang, 2000).

Se conoce una gran cantidad de citoquinas y factores de crecimiento, los cuales se agrupan según sus similitudes estructurales e incluyen los interferones (IFN- α , IFN- β , IFN- γ), las interleuquinas (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, entre otras), los factores estimulantes de colonias (factor estimulante de colonias de granulocitos, G-CSF; factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, GM-CSF), los factores de necrosis tumoral (TNF- α , TNF- β) y los factores de crecimiento transformante (TGF- α , TGF- β).

La capacidad de las citoquinas para regular un vasto número de funciones celulares ha estimulado la investigación acerca de su potencial como agentes terapéuticos. Dado que las mismas participan en múltiples procesos fisiológicos, no es sorprendente que se encuentren involucradas en la patogénesis de muchas enfermedades. Numerosas patologías han sido atribuidas a la ausencia o sobreexpresión de una determinada citoquina o su receptor, lo que ha abierto la posibilidad de un tratamiento terapéutico más racional de las mismas (Mire-Sluis, 1999).

En consecuencia, en las últimas décadas se han identificado y clonado más de 150 citoquinas y factores de crecimiento, muchos de los cuales aún no han sido completamente caracterizados. La tecnología de ADN recombinante ha permitido el clonado y la producción masiva de citoquinas que se utilizan para diferentes aplicaciones clínicas. Algunas citoquinas aprobadas para su uso terapéutico por la FDA (*Food and Drug Administration*, EE.UU.) se detallan en la Tabla I.

Entre las aplicaciones clínicas más comunes de las citoquinas y de los factores de crecimiento se encuentran el tratamiento de cáncer (para lo cual se emplean citoquinas capaces de controlar la proliferación, diferenciación y supervivencia de células progenitoras, como por ejemplo IL-1, IL-2, IL-12, TNF- α , IFNs, GM-CSF), el tratamiento de enfermedades autoinmunes (para esclerosis múltiple se emplea IFN- β , para psoriasis se está estudiando la utilización de

IL-10), el tratamiento de enfermedades virales (en el caso de hepatitis C se emplea IFN- α) y el tratamiento de condiciones inflamatorias (muchos estudios clínicos apuntan al uso de IFN- γ para enfermedades fibróticas, e IL-4 e IL-12 para el asma).

Tabla I. Citoquinas aprobadas para aplicaciones clínicas por la FDA.

Nombre genérico	Citoquina	Aplicación
Neupogen [®] (filgrastim)	G-CSF	Recuperación de pacientes con cáncer que reciben quimioterapia mielosupresora o que recibieron un trasplante de médula ósea; tratamiento de pacientes con leucemia mieloide aguda bajo quimioterapia; neutropenia severa crónica.
Leukine [®] (sargramostim)	GM-CSF	Aceleración de la recuperación de células mieloides en pacientes con leucemia mieloide aguda que reciben quimioterapia o luego de un trasplante alogénico de médula ósea.
Roferon [®]	IFN- α 2a	Leucemia de células vellosas; melanoma maligno; sarcoma de Kaposi en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV); hepatitis B y C crónicas; linfoma folicular; leucemia mieloide crónica.
Intron A [®]	IFN- α 2b	
Avonex [®] Rebif [®]	IFN- β 1a	Esclerosis múltiple.
Betaseron [®]	IFN- β 1b	Formas secundarias progresivas de esclerosis múltiple.
Actimmune [®]	IFN- γ	Enfermedad granulomatosa crónica; osteopetrosis maligna severa.
Proleukin [®]	IL-2	Carcinoma renal; melanoma.
Neumega [®]	IL-11	Prevención de trombocitopenia severa.
Tenovil [®]	IL-10	Artritis reumatoidea; psoriasis; enfermedad de Crohn (fase I de ensayos clínicos).
Axokine [®]	CNTF (factor neurotrópico ciliar)	Tratamiento de obesidad (fase III de ensayos clínicos).

(Rachmawati y col., 2004; datos actualizados a diciembre de 2003)

El uso clínico de citoquinas recombinantes presenta inconvenientes comunes a la obtención y el empleo de proteínas como agentes terapéuticos; a saber, problemas en la producción, estabilidad, grado de pureza y vía de administración, como también su posible inmunogenicidad. Sin embargo, una importante desventaja característica de las citoquinas es su baja estabilidad *in vivo* y su corta vida media en circulación debido a una rápida excreción renal y degradación proteolítica en el plasma. Esta rápida eliminación del torrente sanguíneo disminuye su actividad sobre las células, y dado que la actividad óptima se alcanza luego de largos tiempos de exposición, se requiere una administración repetida y frecuente para lograr el efecto biológico esperado. Otra limitación del uso de citoquinas reside en su pleiotropismo. Debido a que sus receptores son expresados en un gran número de células y tejidos, la aplicación sistémica de dichas proteínas puede desencadenar fácilmente efectos indeseados (Rachmawati y col., 2004).

Estos inconvenientes demandan el uso de citoquinas con propiedades mejoradas para aumentar su eficacia terapéutica y reducir sus efectos adversos durante la terapia. Se han

desarrollado numerosas estrategias con el fin de mejorar la estabilidad y solubilidad de las citoquinas, dirigir las hacia los blancos adecuados (especificidad), reducir su inmunogenicidad y optimizar sus propiedades farmacocinéticas. Dichos métodos, que incluyen manipulación de la estructura primaria, incorporación de modificaciones químicas y post-traduccionales y utilización de proteínas de fusión, entre otros, constituyen los medios para el diseño, ingeniería y optimización de candidatos terapéuticos.

2. INTERFERONES

Numerosas investigaciones de la década de 1930 demostraron que animales infectados por un virus eran frecuentemente resistentes a una co-infección simultánea con un segundo virus, fenómeno que se conoció como "interferencia viral". Dos décadas de estudio de este fenómeno culminaron en 1957 cuando los virólogos Isaacs y Lindenmann descubrieron que este efecto se producía por la liberación celular de un factor soluble que denominaron interferón (IFN). Esta sustancia podía ser separada del virus y protegía a las células sanas de la acción de éste y otros virus (Isaacs y Lindenmann, 1957; Gresser, 1984; Klaus y col., 1997). Estudios posteriores caracterizaron al IFN como un grupo de proteínas con actividad antiviral, sintetizadas y secretadas por células somáticas de todos los mamíferos, incluyendo al hombre. Actualmente, se describe a los IFNs como una familia de citoquinas clave del sistema inmune innato y adquirido con diversas funciones biológicas, incluyendo actividad antiviral, antiproliferativa e inmunomoduladora.

2.1. CLASIFICACIÓN Y NOMENCLATURA DE LOS INTERFERONES

Originalmente, los IFNs fueron clasificados, de acuerdo con el tipo celular de origen, en IFN leucocitario, fibroblástico e inmune. La nomenclatura actual tiene en cuenta que las diferentes formas moleculares del IFN no son producidas por un único tipo celular y emplea el alfabeto griego para denominarlas. De esta manera, se los designa como IFN- α (leucocitario), IFN- β (fibroblástico) e IFN- γ (inmune), incluyéndose además al IFN- ω , IFN- τ e IFN- δ (Sen y Lengyel, 1992).

Por otra parte, se los puede clasificar en dos grandes grupos. Los IFNs de tipo I comprenden fundamentalmente al IFN- α e IFN- β y son producidos por casi todos los tipos celulares como respuesta directa a una infección viral. Derivan de un mismo gen ancestral y poseen aún suficiente homología estructural como para actuar a través de su unión a un mismo receptor celular. Además, tienen la característica de ser estables a pH ácido (pH=2). El IFN- α está constituido por una familia de 14 proteínas diferentes pero estructuralmente relacionadas, mientras que el IFN- β se encuentra representado por una única especie molecular. Los IFN- ω , IFN- τ e IFN- δ también son miembros de este grupo. El IFN- ω presenta un 60% de homología con la familia de genes del IFN- α . Sin embargo, si bien ambos tipos de IFN son producidos por linfocitos activados por virus y poseen similar actividad antiviral sobre líneas celulares humanas, el IFN- ω es antigénicamente diferente y difiere en su interacción con el receptor de tipo I (Horton y col., 1999). El IFN- τ (trofoblástico) no es inducido por virus y ha sido identificado sólo en rumiantes, si bien es activo sobre células humanas. Se produce en forma constitutiva en embriones de rumiantes y provee una función importante para el establecimiento de la preñez (Martal y col., 1998). El IFN- δ es el más pequeño de todos los IFNs y se ha encontrado sólo en

trofoblastos de cerdo. Posee una alta actividad antiviral sobre células porcinas pero no sobre células humanas (Lefevre y col., 1998).

El único IFN de tipo II que se conoce es el IFN- γ , el cual en vez de ser inducido directamente por una infección viral, es sintetizado por linfocitos T activados y células NK (*natural killer*) en respuesta al reconocimiento de células infectadas. A diferencia de los anteriores, el IFN- γ es lábil en condiciones ácidas y actúa a través de un receptor diferente (Pestka y col., 1983; De Maeyer y De Maeyer-Guignard, 1994; Goodbourn y col., 2000; Bekisz y col., 2004).

2.2. GENES Y PROTEÍNAS DE LOS INTERFERONES DE TIPO I

Los genes de los IFNs de tipo I humanos se encuentran agrupados en el brazo corto del cromosoma 9. Existen por lo menos 18 genes no alélicos de IFN- α , 4 de los cuales son pseudogenes, 6 genes no alélicos de IFN- ω , de los cuales sólo uno es funcional, y un único gen de IFN- β (Sen y Lengyel, 1992; Díaz, 1995). A diferencia de la mayoría de los genes estructurales del genoma humano, incluyendo aquéllos que codifican para el resto de las citoquinas, todos los genes de los IFNs de tipo I carecen de intrones, lo que sugiere que podrían haber evolucionado a partir de un único gen ancestral. Se estima que la separación entre los genes del IFN- α e IFN- β se habría producido hace unos 500 millones de años, mientras que la diversificación del IFN- α y su separación del IFN- ω habría ocurrido más recientemente (Donnelly, 1994; Vilcek y Sen, 1996).

Los diferentes subtipos de IFN- α consisten en proteínas maduras de 166 aminoácidos (con excepción del IFN- α 2 que posee 165 residuos aminoácídicos), mientras que el IFN- ω posee seis aminoácidos adicionales en el extremo C-terminal, resultando en una proteína madura de 172 aminoácidos. Ambas proteínas muestran una homología superior al 60%. Por otra parte, el IFN- β es una proteína de 166 aminoácidos, pero presenta un menor grado de homología con el IFN- α (30% en su secuencia aminoacídica y 45% en su secuencia de nucleótidos). Una de las características más conservadas entre los IFNs de tipo I es la presencia de puentes disulfuro en su estructura terciaria, conteniendo los IFN- α y el IFN- ω dos puentes disulfuro, y el IFN- β sólo uno (Bekisz y col., 2004).

2.3. INDUCCIÓN, PRODUCCIÓN Y MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS INTERFERONES DE TIPO I

A nivel celular, el sistema de IFN está constituido por dos etapas: la etapa de inducción/producción y la etapa de acción. En presencia de determinados inductores, la producción de IFN es regulada a nivel transcripcional, predominantemente por complejos de factores de transcripción, y a nivel post-transcripcional, a través de la desestabilización del ácido ribonucleico mensajero (ARNm). Luego de su secreción, el IFN interacciona con el complejo receptor de tipo I, lo que resulta en la activación de múltiples cascadas de señales que derivan en la transcripción de numerosos genes estimulados por IFN (ISGs, *IFN-stimulated genes*) y, consecuentemente, en las funciones biológicas de los IFNs de tipo I (Fig. 1) (Bekisz y col., 2004).

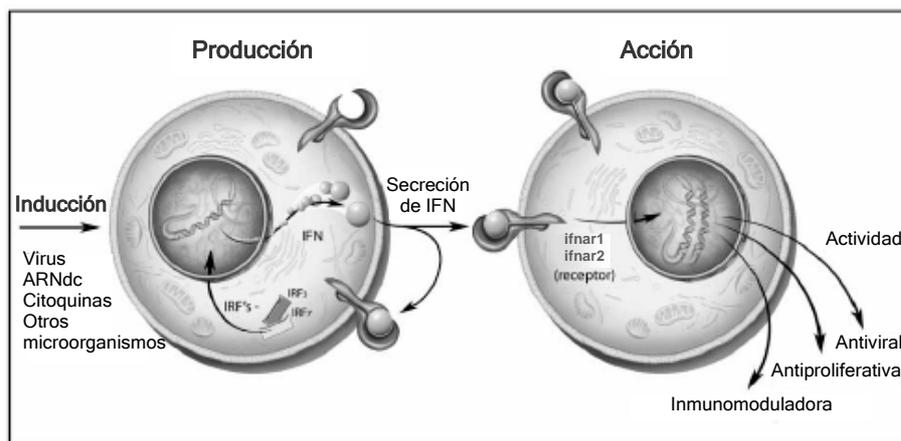


Fig. 1. Inducción, producción y acción de los interferones de tipo I.

La producción de IFN puede ser inducida por diversos agentes (virus y citoquinas, entre otros). Luego de su secreción, el IFN se une al complejo receptor de tipo I, resultando en efectos antivirales, antiproliferativos e inmunomoduladores (Bekisz y col., 2004).

2.3.1. INDUCTORES DE LA SÍNTESIS DE INTERFERÓN

La producción de IFNs de tipo I no es una función celular especializada, por lo que prácticamente todas las células nucleadas del organismo son capaces de sintetizarlos. La producción de IFN sólo requiere que las células se encuentren metabólicamente activas y que sean estimuladas por un inductor apropiado.

Los inductores de IFN pueden ser una gran variedad de agentes naturales o sintéticos, dentro de los cuales los virus y ciertos ARN doble cadena (ARNdc) de alto peso molecular son generalmente los más efectivos. Se ha observado que los virus constituidos por ácido desoxirribonucleico (ADN) son inductores menos potentes de la síntesis de IFNs que los virus a ARN. Las infecciones con bacterias (especialmente aquéllas que se replican dentro de las células, como *Listeria monocytogenes*), micoplasmas y protozoos también pueden estimular la síntesis de IFN en ciertos tipos celulares, especialmente en células fagocíticas mononucleares. El lipopolisacárido bacteriano es un potente inductor de IFN- α e IFN- β en monocitos y macrófagos. Ciertas citoquinas y factores de crecimiento, como IL-1, IL-2, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor estimulante de colonias 1 (CSF-1), también pueden desencadenar la producción de IFN (Krim, 1980; De Maeyer y De Maeyer Guignard, 1994; Vilcek y Sen, 1996).

2.3.2. RECEPTORES DE INTERFERÓN

Los IFNs no son moléculas efectoras, sino que deben unirse a un receptor específico de la superficie celular para ejercer su acción. A diferencia de lo que se creía anteriormente, esta unión no es específica de especie sino de un rango de huéspedes definido y característico, ya que, aunque los IFNs generalmente poseen mayor actividad sobre células pertenecientes a su especie de origen, pueden ejercer sus efectos biológicos sobre células de especies filogenéticamente distantes (Krim, 1980; Sen y Lengyel, 1992).

Todos los IFNs de tipo I se unen a un receptor que consiste en dos proteínas transmembrana, denominadas ifnar1 e ifnar2, que se asocian luego de la unión de la molécula de IFN. Ambas proteínas se encuentran codificadas por genes ubicados en el cromosoma 21. La

subunidad ifnar1 es una proteína altamente glicosilada, con una masa molecular aparente de 135 kDa, mientras que la subunidad ifnar2 también se encuentra glicosilada y existe como una variante larga (115 kDa) o corta (55 kDa) como resultado de un *splicing* alternativo del ARNm. Sin embargo, sólo la asociación de ifnar1 con la variante larga de ifnar2 (ifnar2c) puede iniciar el camino de transducción de señales (Lu y col., 1998; Roisman y col., 2001; Kunzi y Pitha, 2003). Se ha demostrado que la subunidad ifnar2c es la responsable de la interacción con el ligando, probablemente reclutando en forma subsecuente a la subunidad ifnar1, la cual se requiere para la formación de un receptor de alta afinidad (Russel-Harde y col., 1995; Chuntharapai y col., 1999).

El receptor de tipo I se encuentra presente en baja abundancia en los principales tipos celulares de todos los vertebrados (entre 100 y 5.000 sitios de unión por célula). Una característica muy importante de este receptor es su capacidad de discriminar entre los diferentes tipos y subtipos de IFN y de llevar a cabo diferentes respuestas biológicas dependiendo del tipo de ligando que se encuentra unido (Bekisz y col., 2004).

2.3.3. TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL

La unión del IFN al receptor desencadena la rápida activación de las quinasas Tyk2 (*Tyrosine kinase-2*) y Jak1 (*Janus kinase-1*), las cuales se encuentran asociadas físicamente a los dominios intracelulares de las subunidades ifnar1 e ifnar2, respectivamente. Estas enzimas sufren una fosforilación recíproca y, sucesivamente, fosforilan los residuos de tirosina de los dominios citoplasmáticos del receptor, así como también un residuo de tirosina del extremo C-terminal de las proteínas STAT (*signal transducers and activators of transcription*). Una vez fosforilado, el heterotrímero STAT (constituido por las proteínas STAT-1 α , STAT-1 β y STAT-2 de 91, 84 y 113 kDa, respectivamente) se une a la proteína de unión a ADN denominada p48 (de 48 kDa, también denominada IRF-9), formando un complejo de transcripción llamado ISGF3 (*IFN-stimulated gene factor-3*). Luego de su formación, el complejo ISGF3 transloca al núcleo, donde se une a una secuencia de ADN denominada ISRE (*IFN-stimulated response element*) que se encuentra presente en las regiones promotoras de los genes estimulados por IFN, e inicia su transcripción a ARNm para sintetizar las proteínas mediante las cuales los IFN ejercen su acción biológica (Fig. 2A) (Runkel y col., 1998a; Kunzi y Pitha, 2003; Bekisz y col., 2004; Billiau, 2006).

2.4. ACCIONES BIOLÓGICAS DE LOS INTERFERONES DE TIPO I

Los IFNs poseen actividad biológica pleiotrópica debido a su capacidad de inducir una gran variedad de efectos sobre sus células diana, los cuales son llevados a cabo por proteínas efectoras codificadas por los ISGs.

Sus principales funciones biológicas incluyen actividad antiviral, antiproliferativa o antitumoral e inmunomoduladora.

2.4.1. ACTIVIDAD ANTIVIRAL

Los IFNs de tipo I poseen un importante rol en la resistencia del huésped a la infección viral, ya que ocupan la primera línea de defensa previa a la activación de los mecanismos inmunes. En contraste con la alta especificidad del sistema inmune, los IFNs ofrecen protección

contra un amplio espectro de virus, ya sea virus a ARN simple hebra (positiva y negativa) y doble hebra y virus a ADN, así como también contra otros microorganismos de replicación intracelular (Krim, 1980).

El sistema de IFN puede afectar diferentes pasos de la replicación viral, incluyendo la penetración, pérdida de la envoltura, transcripción, traducción, maduración y liberación de los viriones. Diferentes caminos bioquímicos inducidos por IFN pueden ser responsables de la inhibición de la replicación de diferentes virus (Sen y Lengyel, 1982).

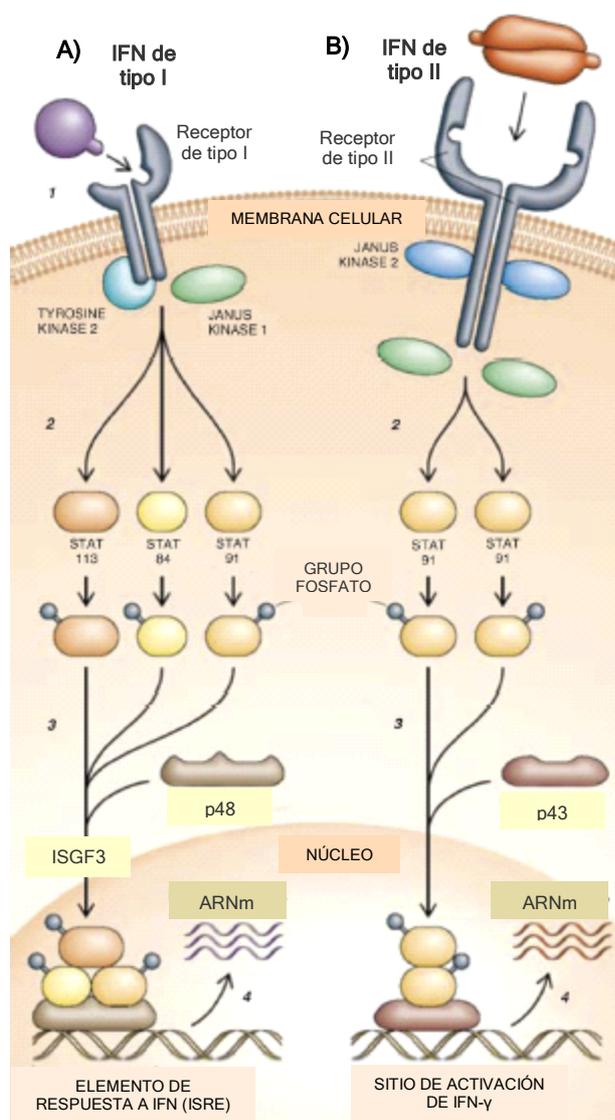


Fig. 2. Mecanismo de transducción de señales de los interferones.

(A) Interferones de tipo I. (1) El IFN interactúa con el receptor, (2) se produce la activación de las quinasas Tyk2 y Jak1 y la consecuente fosforilación de las proteínas STAT, (3) las proteínas STAT forman un heterotrímero y se asocian a una proteína de 48 kDa para formar el complejo ISGF3, (4) el complejo actúa como un factor de transcripción, estimulando la expresión de genes de respuesta a IFN.

(B) Interferones de tipo II.
Adaptado de Billiau (2006).

Los efectos antivirales son ejercidos mediante la síntesis de diferentes proteínas inducidas por IFN, siendo las más estudiadas la familia de enzimas conocida como

2'-5'oligoadenilato sintetasa (OAS), la proteína quinasa R dependiente de ARN doble hebra (PKR) y las proteínas de resistencia a myxovirus (Mx). Las proteínas OAS son inducidas por la presencia de ARN doble cadena y catalizan la síntesis de oligonucleótidos de conformación inusual (2'-5') que activan a una ARNasa L latente, la cual degrada el ARN viral y celular, inhibiendo la síntesis proteica. La PKR fosforila al factor de iniciación de la transcripción eIF2 α , resultando en la inhibición de la síntesis de proteínas virales y celulares (Fig. 3). Las proteínas Mx constituyen una familia de GTPasas inducibles por IFN que, a diferencia de los dos mecanismos anteriores, poseen actividad antiviral sobre virus específicos. Por ejemplo, la proteína Mx murina provoca un estado antiviral que está dirigido específicamente contra la replicación del virus influenza (De Maeyer y De Maeyer-Guignard, 1994; Goodbourn y col., 2000; Kunzi y Pitha, 2003). Estudios recientes demostraron que ratones simultáneamente deficientes de ARNasa L, PKR y Mx conservan su sensibilidad a la acción antiviral del IFN. Esto indicaría la existencia de ISGs adicionales con efectos antivirales (de Veer y col., 2001).

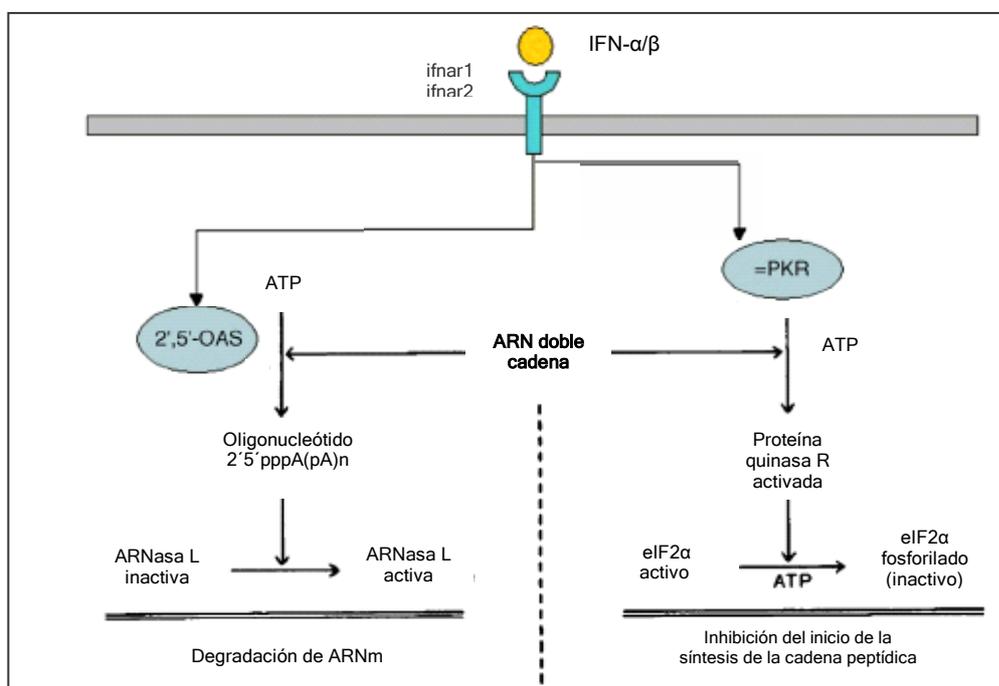


Fig. 3. Mecanismos antivirales de los IFNs de tipo I.

La acción antiviral de los IFNs se lleva a cabo principalmente mediante dos mecanismos paralelos inducidos por la presencia de ARN doble cadena: a través de la síntesis de oligonucleótidos de conformación inusual por la 2'-5' OAS, los cuales activan la ARNasa L, que produce la degradación del ARNm; y mediante la activación de la PKR, la cual fosforila al eIF2 α , inhibiendo el inicio de la traducción (Adaptado de Billiau, 2006).

2.4.2. ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA Y ANTITUMORAL

Los IFNs pueden inhibir el crecimiento celular de células normales y tumorales. Sin embargo, la sensibilidad de las células a los efectos antiproliferativos del IFN es extremadamente dependiente del tipo celular. Mientras que muchos tipos celulares no responden al IFN, el crecimiento de células Daudi (línea celular derivada del linfoma de Burkitt) es completamente detenido en presencia de tan sólo 1 UI.ml⁻¹ de IFN- α (Goodbourn y col., 2000).

Debido a la importancia clínica de las propiedades citostáticas del IFN, la regulación negativa del crecimiento ha sido estudiada intensamente y se ha encontrado que se produce a través de diversos mecanismos. Los efectos de los IFNs sobre tumores *in vivo* pueden resultar de una acción directa del IFN sobre la célula tumoral o, indirectamente, a través de diferentes mecanismos efectores como la estimulación de la expresión de antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), la activación de macrófagos y la estimulación de la actividad de linfocitos T y células NK.

El principal efecto antiproliferativo de los IFNs es la prolongación del ciclo celular. Se ha demostrado que los IFNs aumentan en forma específica los niveles del inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina p21, la cual posee un rol esencial en la progresión desde la fase G₁ a la fase S. El producto del gen p202, también inducido por IFN, actúa como un potente represor del ciclo celular.

Por otro lado, los IFNs pueden disminuir la transcripción y expresión de varios oncogenes como *c-myc*, *c-mos*, *c-abl*, *c-src*, entre otros, inhibiendo la proliferación del tumor. Por ejemplo, el tratamiento de células Daudi con IFN- β produce una reducción de los niveles de ARNm de *c-myc* en tan sólo tres horas desde su adición, derivando en la inhibición del crecimiento celular.

Adicionalmente, existe evidencia de un rol de las proteínas PKR, 2'-5' oligoadenilato sintetasa y ARNasa L en las funciones antiproliferativas de los IFNs (De Maeyer y De Maeyer-Guignard, 1994; Sotoca Momblona, 1999; Goodbourn y col., 2000).

2.4.3. ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA

Los IFNs son importantes moduladores del sistema inmune, tanto sobre la inmunidad innata como sobre la inmunidad adquirida.

Una función importante de los IFNs de tipo I sobre la inmunidad inespecífica es aumentar la citotoxicidad de las células NK y la capacidad fagocítica de los macrófagos.

Además, los IFNs estimulan la síntesis de las citoquinas IL-1, IL-6 y TNF, las cuales aumentan la expresión de receptores para el fragmento constante de las inmunoglobulinas (Fc) y para la fracción C3 del complemento. Estos mecanismos favorecen la fagocitosis de inmunocomplejos y la capacidad lítica de microorganismos mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

Por otro lado, los IFNs de tipo I también poseen un importante rol sobre la inmunidad adquirida, ya sea mediante la inducción de IL-15, la cual estimula la división de las células T de memoria, o mediante el aumento de la síntesis de anticuerpos por linfocitos B.

Todos los IFNs comparten la capacidad de aumentar la expresión de las proteínas del MHC de tipo I y, por lo tanto, de promover las respuestas de los linfocitos T CD8⁺, mientras que sólo el IFN de tipo II (IFN- γ) es capaz de estimular la expresión de los antígenos del MHC de tipo II, promoviendo las respuestas de células CD4⁺ (De Maeyer y De Mayer-Guignard, 1994; Goodbourn y col., 2000; Meager, 2002).

3. INTERFERÓN- α

3.1. SUBTIPOS DE IFN- α

Como se mencionó anteriormente, el IFN- α humano no está representado por una única molécula, sino que consiste en una familia de 14 proteínas estructuralmente relacionadas, las cuales se distinguen empleando una nomenclatura numérica: IFN- α 1, IFN- α 2, IFN- α 4, IFN- α 5, IFN- α 6, IFN- α 7, IFN- α 8, IFN- α 10, IFN- α 13, IFN- α 14, IFN- α 16, IFN- α 17, IFN- α 21 e IFN- α 22 (Bekisz y col., 2004). Numerosos trabajos se han centrado en la identificación y caracterización de dichos subtipos mediante su producción empleando fuentes naturales. Por ejemplo, se han aislado 9 clases de IFN- α producidas por linfocitos de sangre periférica humana luego de su inducción con virus Sendai (Nyman y col., 1998a), mientras que se pudieron identificar 5 variantes de IFN- α en células Namalwa infectadas con el mismo virus (Allen y Fantes, 1980).

Todos los subtipos de IFN- α son proteínas de secreción, por lo que son sintetizadas como precursores que poseen un péptido señal de 23 aminoácidos en su extremo N-terminal. El péptido de secreción es clivado para dar lugar a las proteínas maduras, que contienen 166 aminoácidos, con excepción del IFN- α 2, cuya longitud se reduce a 165 aminoácidos por carecer del residuo ácido aspártico en la posición 44.

Las diferentes especies de IFN- α comparten entre un 75 y un 99% de homología en su secuencia aminoacídica, con 79 residuos conservados de un total de 166 aminoácidos. Las proteínas IFN- α 1 e IFN- α 13 son idénticas y difieren sólo en un aminoácido de su péptido señal. Los pares α 4/ α 7, α 4/ α 17, α 5/ α 22 y α 8/ α 10 presentan un alto grado de homología, con sólo 7 a 9 residuos diferentes. El IFN- α 2 posee tres variantes alélicas, IFN- α 2a, 2b y 2c, las cuales difieren en 1 o 2 aminoácidos. De esta manera, mientras que el IFN- α 2a presenta lisina en la posición 23, el IFN- α 2b y el IFN- α 2c presentan arginina. Además, el IFN- α 2c posee una arginina adicional en lugar de histidina en la posición 34 (Kontsek, 1994; Bekisz y col., 2004).

La masa molecular aparente promedio de los subtipos de IFN- α producidos en forma recombinante en bacterias, calculada mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con el agregado de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), es de aproximadamente 19 kDa. Sin embargo, la masa molecular del IFN- α derivado de leucocitos humanos inducidos por el virus Sendai varía entre 17,5 y 23,3 kDa, demostrando la existencia de modificaciones post-traduccionales en al menos uno de los subtipos (Rubinstein y col., 1979; Goeddel y col., 1980; Petska y col., 1983; Zoon y col., 1992; Kontsek, 1994).

La heterogeneidad de los subtipos de IFN- α también queda demostrada por el amplio rango de punto isoeléctrico observado, el cual oscila entre pH 4,5 y 6,9 (Kontsek, 1994).

La mayoría de las especies de IFN- α no contiene sitios consenso para *N*-glicosilación, con excepción del IFN- α 14, que posee dos de los mencionados sitios, uno en la Asn2 y otro en la Asn72, de los cuales sólo el segundo se encuentra ocupado (Nyman y col., 1998a; Nyman y col., 1998b). Por otro lado, el único subtipo en donde se ha demostrado fehacientemente la existencia de *O*-glicosilación es el IFN- α 2, que contiene el disacárido galactosil-*N*-acetilgalactosamina unido a la Thr106. El análisis de la estructura de los carbohidratos de IFN- α 2 de leucocitos humanos mediante espectrometría de masas indicó que dicho núcleo glicosídico se encuentra unido a uno o dos residuos de ácido *N*-acetilneuramínico en una proporción de moléculas, mientras un disacárido (probablemente *N*-acetilgalactosamina) está presente en el resto de la población proteica. El IFN- α 2 producido en células CHO también demostró estar *O*-glicosilado en la misma posición, siendo mayoritaria la población de moléculas conteniendo dos residuos de ácido

N-acetilneuramínico unidos al mismo núcleo. Debido a que sólo las tres variantes alélicas de este subtipo contienen una Thr en la posición 106, es posible que el mismo represente el único IFN- α *O*-glicosilado (Adolf y col., 1991; Sugiyama y col., 1993; Nyman y col., 1998b). El rol de los oligosacáridos en el IFN- α 14 y en el IFN- α 2 no se encuentra claramente establecido. La presencia de carbohidratos no es esencial para su actividad biológica, pero la glicosilación podría tener efectos sobre la farmacocinética, inmunogenicidad y estabilidad de las proteínas.

Se desconoce el significado biológico de la existencia de tal multitud de especies de IFN- α , aunque se piensa que las mismas podrían poseer patrones cuantitativamente diferentes de actividad biológica antiviral, inhibidora del crecimiento y estimuladora de células *NK*.

3.2. ESTRUCTURA DEL IFN- α 2

Los primeros modelos tridimensionales de los IFNs de tipo I humanos fueron predichos en 1982 teniendo en cuenta sus secuencias aminoacídicas. Más recientemente, la estructura terciaria del IFN- α 2b cristalizado fue revelada mediante cristalografía de rayos X (Radhakrishnan y col., 1996), mientras que la correspondiente al IFN- α 2a en solución fue analizada mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (NMR) (Klaus y col., 1997).

Estos estudios demostraron que el IFN- α 2 posee una estructura globular consistente en cinco hélices α designadas con las letras A (Ser11-Met21), B y B' (Thr52-Ser68 y Lys70-Ala75), C (Glu78-Ile100), D (Leu110-Glu132) y E (Pro137-Leu157), lo que permite clasificar a esta proteína dentro del grupo de las citoquinas α -helicoidales. Las hélices se encuentran conectadas por un segmento sobresaliente de gran longitud (lazo AB) y tres segmentos cortos (lazos BC, CD y DE). Cada hélice es aproximadamente recta, con excepción de la hélice B que contiene una curvatura pronunciada de 70° cuyo centro es la Thr69. La hélice α más corta es la A, con 11 aminoácidos, mientras que las hélices restantes contienen en promedio 20 aminoácidos cada una. La topología de la molécula se asemeja al motivo clásico de cuatro hélices (A, B, C y E) empaquetadas, con adición de la hélice D que se une al núcleo mediante una interacción hidrofóbica entre la Thr120 y la Thr121 con la Thr138 de la hélice E (Fig. 4). El núcleo de la estructura helicoidal (definido como aquellos residuos que poseen menos de un 15% de accesibilidad al solvente) se compone básicamente de residuos hidrofóbicos, con excepción de algunos residuos polares ocultos que forman varios puentes de hidrógeno que unen las hélices A, C, D y E. La considerable homología entre el IFN- α 2 y el resto de la familia sugiere que todos los otros miembros presentarían esencialmente la misma estructura.

El nivel de organización estructural más alto de la molécula de IFN- α 2 se encuentra en concordancia con el rol de los puentes disulfuro en la estabilización de su conformación activa. Los cuatro residuos de cisteína conservados en casi todos los interferones de tipo I (1, 29, 99 y 139) forman dos puentes disulfuro intramoleculares (Cys1-Cys98 y Cys29-Cys138 para el IFN- α 2, teniendo en cuenta la ausencia del residuo Asp44). Se ha demostrado que el enlace Cys1-Cys98 carece de un rol funcional o estructural. Sin embargo, la integridad del enlace Cys29-Cys138 es crítica para la actividad biológica del IFN- α 2 (Kontsek, 1994; Vilcek y Sen, 1996).

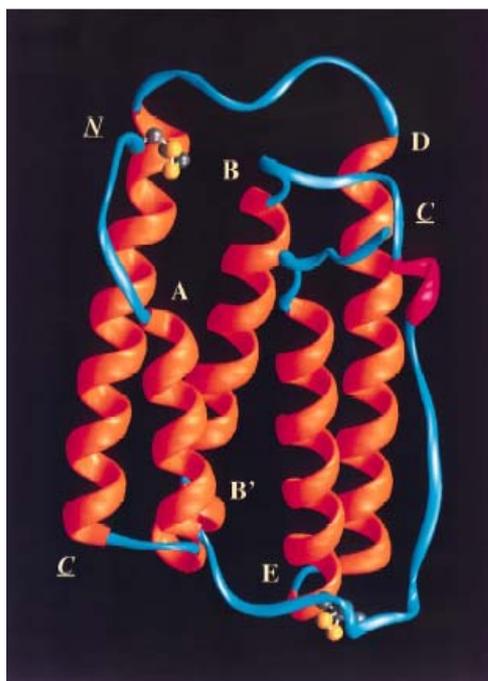


Fig. 4. Estructura del hIFN- α 2.

Representación gráfica en forma de cintas de la estructura tridimensional del hIFN- α 2a. Las hélices α (coloreadas en naranja) se designan con las letras A-E en la cercanía de su extremo N-terminal. Los extremos de la proteína se indican con las letras N y C. Los dos puentes disulfuro se muestran mediante una representación de esferas y bastones; los átomos de azufre se encuentran coloreados en amarillo y los átomos de carbono en gris. La figura fue preparada empleando el programa Ribbons 2.0 (Klaus y col., 1997).

A partir de la homología en la secuencia de aminoácidos del IFN- α y el IFN- β , puede deducirse que el plegamiento tridimensional de ambos es muy similar. La comparación de sus estructuras terciarias permite superponer 116 átomos de $C\alpha$ con una desviación de 1,5 Å. Las posiciones que difieren en más de 2 Å incluyen los residuos 6-9 del extremo N-terminal, 22-33 y 40-51 del lazo AB, 69-76 de la curvatura en la hélice B y 154-159 del extremo C-terminal. En la Fig. 5 se muestra una alineación de las secuencias de aminoácidos del hIFN- α 2b y el hIFN- β basada en la estructura tridimensional de ambos (Radhakrishnan y col., 1996).

IFN- α 2b	. . .CDLPQTH	SLGSRRTLML	LAQMRRISLF	SCLKDRHDFG	FPQEEF.GNQ	FQKAETIPVL
IFN- β	MSYNLLGFLQ	RSSNFQCQKL	LWQLNGRLEY	.CLKDRMNFD	IP EEIKQLQQ	FQKEDAALTI
	1	11	21	30	40	50
IFN- α 2b	HEMIQQIFNL	FSTKDSSAAW	DETL LDKFYT	ELYQQ LNDLE	ACVIQGVGV	ETPLMKEDSI
IFN- β	YEMLQNIFAI	FRQDSSSTGW	NETIVENLLA	NVYHQINHLK	TVLEEKLEKE	DFTRGKLMSS
	60	70	80	90	100	110
IFN- α 2b	LAVRKYFQRI	TLYLKEKKYS	PCAWEVVRAE	IMRSFSLSTN	LQESLRSKE	
IFN- β	LHLKRYYGRI	LHYLKAKEYS	HCAWTIVRVE	ILRN FYFINR	LTGYLRN. . .	
	120	130	140	150	160	166

Fig. 5. Alineación de las secuencias aminoacídicas del IFN- α 2b e IFN- β humanos basada en su estructura tridimensional.

Las secuencias se numeran de acuerdo con la secuencia del IFN- β . En rojo se señala la Thr106 donde se produce la *O*-glicosilación del IFN- α 2b. En verde se señala la Asn80 responsable de la *N*-glicosilación del IFN- β (adaptado de Radhakrishnan y col., 1996).

3.3. REGIÓN MOLECULAR DE UNIÓN AL RECEPTOR DEL IFN- α 2

El hecho de que todos los IFNs de tipo I reconozcan un mismo receptor celular implica un marco estructural común entre los dominios de unión IFN-receptor. Numerosas investigaciones han intentado dilucidar los residuos importantes en la molécula de IFN- α involucrados en dicha interacción.

Entre los años 1992 y 1994, mediante estudios basados en mutagénesis sitio dirigida y comparación de secuencias, diferentes grupos de investigación propusieron la existencia de tres regiones de residuos conservados en el IFN- α 2 implicados en la unión a las diferentes subunidades del receptor. El sitio de unión para el ifnar2 se encontraría en el lazo AB (residuos 29-36) y en las hélices D y E (residuos 122-139) y el sitio de unión para el ifnar1 estaría ubicado principalmente en la hélice C (residuos 78-95) (Klaus y col., 1997).

En 1999, Piehler y Schreiber realizaron estudios de cinética de unión en tiempo real entre diferentes mutantes de IFN- α 2 y la subunidad ifnar2c, encontrando una buena correlación entre la actividad biológica antiviral y la afinidad de unión al receptor de las diferentes muteínas. De esta manera, evaluando la estabilidad del complejo a través de la medición de su constante de disociación, establecieron que los aminoácidos Leu30 y Leu33 serían puntos clave en la interacción con ifnar2c y, junto con los residuos Leu26 y Phe27, formarían el centro del sitio de unión. Otros seis residuos adyacentes a los anteriores (Lys31, Asp32, His34, Asp35, Arg125 y Lys133) tendrían también un efecto significativo en la estabilización del complejo y estarían rodeados de residuos inertes en la interacción.

En el año 2000, el mismo grupo de investigadores realizó nuevas contribuciones al tema, identificando seis aminoácidos designados como "*hotspots*" en la unión al ifnar2, debido a que su mutación resultó en una disminución de la afinidad de unión en más de 20 veces: Leu30, Arg33 (ambos ubicados en el lazo AB), Arg144, Ala145, Met148 y Arg149 (ubicados en la hélice E). Contrariamente a lo que se pensaba, estos hallazgos indican que la hélice E constituye el centro del sitio de unión al ifnar2 (residuos 144-153), con una alta contribución de la primera parte del lazo AB (residuos 26-34) y una mínima contribución de la hélice D (Lys133) y de la hélice A (Leu15). Dos residuos adicionales (Arg12 y Glu146) probablemente afectarían la interacción (Fig. 6). Estos resultados coinciden con los obtenidos para otras citoquinas homólogas (IFN- β , IL-19, IL-22), en las cuales la hélice E constituye una región clave para la unión al receptor (Piehler y col., 2000; Roisman y col., 2001). Estudios más recientes utilizando espectroscopía NMR concuerdan con los resultados obtenidos mediante mutagénesis (Chill y col., 2003).

Existen controversias acerca de la participación del extremo C-terminal del IFN- α 2 en la unión al ifnar2, ya que ciertos autores encontraron que IFNs truncados en dicho extremo conservan intacta su actividad biológica antiviral (Piehler y col., 2000), mientras que otros han reportado que modificaciones en el extremo C-terminal contribuyen a una unión diferencial al receptor y a variaciones en la actividad biológica entre IFNs (Slutzki y col., 2006).

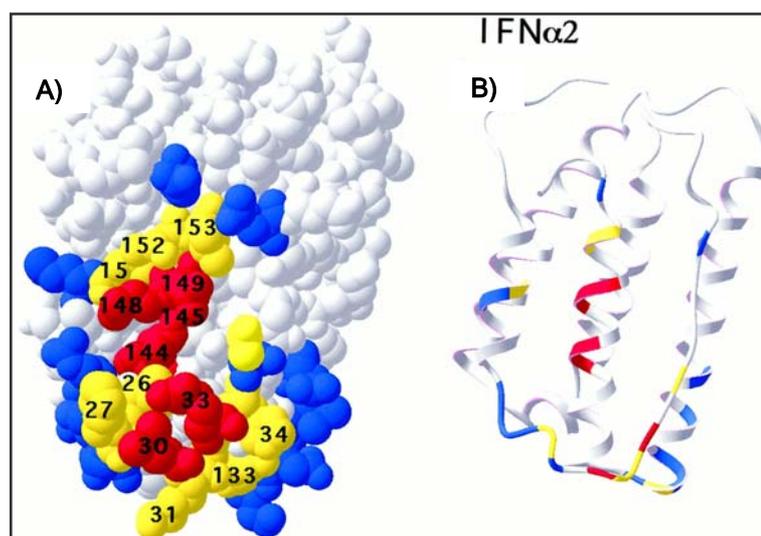


Fig. 6. Localización de los aminoácidos del IFN- α 2 implicados en la unión a la subunidad ifnar2 del receptor.

A) Representación tridimensional que muestra el volumen ocupado por cada átomo, graficados como esferas de Van der Waals.

B) Representación tridimensional en forma de cinta.

Los residuos claves en la interacción con el receptor se señalan en rojo ("hotspots"). Los residuos con efecto significativo en la estabilización del complejo se colorean en amarillo. Los aminoácidos inertes en la unión al receptor se indican en azul (Piehler y col., 2000).

La unión del IFN- α al ifnar1 es débil, transitoria y ha sido poco estudiada. Recientemente, se reportó que el sitio de unión al ifnar1 estaría ubicado en el centro de las hélices B y C, enfrente al sitio de unión al ifnar2. De los 9 aminoácidos que estarían involucrados en dicha interacción (Tyr85, Tyr89, His57, Glu58, Gln61, Phe64, Asn65, Thr69 y Leu80), tres confirieron un incremento de la afinidad cuando fueron mutados por alanina, lo que sugiere que la unión del IFN- α a la subunidad ifnar1 es sub-óptima (Fig. 7). Por otro lado, la mayoría de las mutaciones que evidenciaron un cambio en la afinidad de unión tuvieron un efecto más pronunciado sobre la actividad antiproliferativa que sobre la actividad antiviral, lo cual indicaría que la afinidad de unión hacia ifnar1 está directamente relacionada a la actividad antiproliferativa del IFN (Roisman y col., 2005).

Se ha sugerido que la activación diferencial de los caminos de señalización que derivan en las diferentes actividades biológicas de los IFNs de tipo I es una función directa de la concentración de IFN y del receptor en la superficie celular y de las afinidades de unión hacia las diferentes subunidades (Hu y col., 1993; Runkel y col., 1998a; Jaitin y col., 2006). En particular, se ha podido demostrar que una mutante del IFN- α 2 con una mayor afinidad al ifnar1 (por mutación de los residuos His57, Glu58 y Gln61) es funcionalmente similar al IFN- β , ya que posee una mayor actividad antiproliferativa pero no presenta cambios notables en su actividad antiviral (Jaitin y col., 2006). Además, se ha observado que los diferentes subtipos de IFN- α producidos en células Namalwa por inducción con el virus Sendai poseen un amplio rango de actividad antiproliferativa sobre células Daudi (con diferencias de actividad de hasta 2.000 veces). Por otro lado, la relación entre la potencia antiviral y antiproliferativa de cada subtipo es diferente, lo que sugiere que ambas actividades no son inducidas por los mismos segmentos moleculares. La alta homología entre subtipos indica que sutiles diferencias en la secuencia de aminoácidos podrían contribuir a la capacidad pleiotrópica del IFN- α (Hu y col., 1993; Kontsek, 1994).

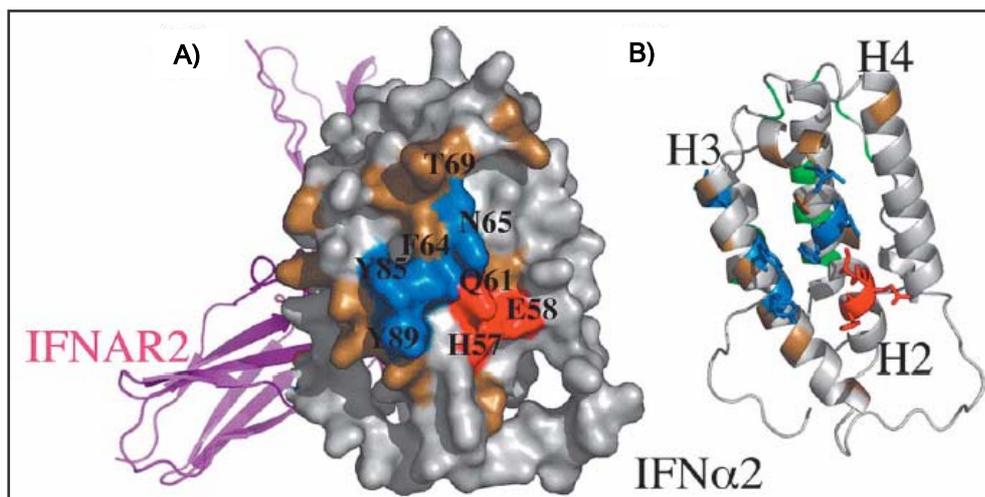


Fig. 7. Localización de los aminoácidos del IFN-α2 implicados en la unión a la subunidad ifnar1 del receptor.

A) Representación tridimensional de la superficie del IFN-α2 formando complejo con el ifnar2.

B) Representación tridimensional del IFN-α2 en forma de cinta.

Los residuos que producen un aumento o disminución de la afinidad de unión al ifnar1 luego de su mutación se colorean en rojo o azul, respectivamente. Los residuos que se unen al ifnar2 se muestran en verde. Los residuos que no muestran un efecto significativo en la interacción se señalan en marrón (Roisman y col., 2005).

3.4. IFN-α2 RECOMBINANTE

El IFN-α2 fue la primera citoquina clonada, secuenciada en forma completa, producida en forma recombinante y purificada a homogeneidad. Además, luego de una larga y accidentada historia de ensayos clínicos, el IFN-α2 fue la primera citoquina que alcanzó una aplicación clínica generalizada.

El IFN-α2a humano recombinante (rhIFN-α2a; Roferon-A[®], Hoffmann La Roche, Inc.) y el IFN-α2b humano recombinante (IFN-α2b; Intron-A[®], Schering-Plough) fueron los dos primeros IFNs aprobados por la FDA para el tratamiento de leucemia de células vellosas (LCV) en EE.UU. en 1986. Ambas proteínas son producidas en forma masiva en *Escherichia coli* (*E. coli*) y, si bien carecen de modificaciones post-traduccionales (*O*-glicosilación en la Thr106), conservan intacta la actividad biológica del IFN-α2 natural. Actualmente, estos IFNs y sus variantes modificadas mediante la adición de polietilenglicol (PEG-Intron[®], Schering-Plough, y PEGASYS[®], Hoffman La Roche, Inc.) se encuentran aprobados en un gran número de países para su uso clínico en el tratamiento de una amplia variedad de patologías virales y cancerígenas.

El rhIFN-α2 puede ser administrado en forma intramuscular, subcutánea o intravenosa. Si bien cada vía de administración resulta en un perfil farmacocinético diferente, todas producen una rápida inactivación y eliminación de la citoquina de los fluidos y tejidos biológicos. Por ejemplo, empleando la vía endovenosa, el tiempo de vida media en plasma del rhIFN-α2 en humanos es de aproximadamente 4 h, llegando a valores indetectables antes de las 18 h desde su administración. El catabolismo del rhIFN-α2 es fundamentalmente renal mediante filtración glomerular y reabsorción tubular, en la que se produce la degradación proteolítica (Bino y col., 1982; Sotoca Momblona, 1999). Otras rutas de eliminación minoritarias incluyen la

proteólisis e inactivación por proteasas séricas y la endocitosis mediada por receptor (Peleg-Shulman y col., 2004).

3.4.1. USOS CLÍNICOS DEL rhIFN- α 2

La aplicación más exitosa del rhIFN- α 2 para el tratamiento de patologías virales se centra en su uso como terapia para la hepatitis crónica activa, ya sea aquella causada por el virus de la hepatitis B (HBV) como por el de la hepatitis C (HCV). Luego de un tratamiento de 6 meses, el 40% de los pacientes que padecen hepatitis B crónica responden a la terapia con rhIFN- α 2. En el caso de la hepatitis C crónica es habitual la infección con múltiples cepas virales (algunas de ellas resistentes a IFN- α 2), por lo que se emplean otros agentes antivirales, como por ejemplo la ribavirina, para potenciar su acción. Recientemente, se ha sugerido la terapia con rhIFN- α 2 para el tratamiento de pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), preferentemente en etapas tempranas de la enfermedad.

Como agente antitumoral, el rhIFN- α 2 se emplea en enfermedades hematológicas malignas y ciertos tumores sólidos. En la LCV, una forma rara de leucemia de células B, el tratamiento con rhIFN- α 2 produce la disminución de la infiltración de células malignas en la médula ósea. En la leucemia mieloide crónica (LMC), una enfermedad caracterizada por la presencia de una aberración genética conocida como cromosoma Filadelfia, el rhIFN- α 2 suprime selectivamente la proliferación de las células cancerígenas. El rhIFN- α 2 también tiene actividad terapéutica en linfomas de diversos fenotipos histológicos (como por ejemplo linfoma de células T cutáneo) y en mieloma múltiple. Por otro lado, el porcentaje de pacientes que responden al tratamiento de tumores sólidos (como por ejemplo melanoma y carcinoma de células renales) es generalmente menor. Sin embargo, la terapia del sarcoma de Kaposi en pacientes afectados con el virus HIV produce una regresión de la patología en un 40% de los pacientes, lo cual se debe a la capacidad del rhIFN- α 2 de inhibir la angiogénesis (Gutterman, 1994; Borden y col., 2000; Brassard y col., 2002).

3.4.2. EFECTOS ADVERSOS DEL rhIFN- α 2

Los IFNs, como la mayoría de las citoquinas, son producidos por el organismo para actuar en forma local. Su empleo como fármaco sistémico puede producir cierta toxicidad en los pacientes. Los efectos adversos más comunes de la terapia con rhIFN- α 2 incluyen fiebre, síntomas semejantes a la gripe, fatiga, escalofríos, dolor de cabeza, náuseas, pérdida del apetito, pérdida de peso y algunos efectos psicológicos como depresión, irritabilidad y cambios en la personalidad. Además, se ha demostrado que el rhIFN- α 2 puede ser inmunogénico en algunos pacientes, generando anticuerpos neutralizantes que raramente han sido asociados con su toxicidad, aunque podrían ser responsables del fracaso terapéutico de la citoquina durante el curso de tratamientos crónicos. Por último, aproximadamente un 2% de los pacientes presentan reacciones adversas graves como enfermedades autoinmunes (psoriasis, artritis reumatoidea) y fallos renales o cardíacos agudos (Gutterman, 1994; Bekisz, 2004).

En general, cuanto mayor es la dosis de rhIFN- α 2 administrada, mayor es la frecuencia y severidad de los efectos secundarios observados. Como se dijo anteriormente, esta citoquina es rápidamente inactivada y eliminada del organismo luego de su administración, por lo que se necesitan dosis altas y frecuentes para alcanzar la ventana terapéutica.

4. GLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS

Las glicoproteínas constituyen una clase de glicoconjugados que resultan de la unión covalente de cadenas hidrocarbonadas a proteínas. La glicosilación es el evento post-traducciona l más importante que realizan las células eucariotas y afecta muchas propiedades de las glicoproteínas, entre ellas su solubilidad, farmacocinética, bioactividad, secreción, *clearance in vivo* y antigenicidad (Montreuil y col., 1994; Restelli y Butler, 2002).

4.1. TIPOS DE GLICOSILACIÓN Y ESTRUCTURA DE LOS OLIGOSACÁRIDOS

Los oligosacáridos se pueden conjugar a las cadenas polipeptídicas a través de dos tipos de enlaces covalentes, *N*-glicosil y *O*-glicosil, lo cual lleva a la definición de tres clases de glicoproteínas: *N*-glicosilproteínas, *O*-glicosilproteínas y *N, O*-glicosilproteínas. Existe un tercer tipo de enlace, denominado anclaje GPI, en el cual el oligosacárido es un componente del glicosil fosfatidil inositol (GPI), que se encuentra como una parte integral de la membrana. Esta modificación está ausente en las formas secretadas de las glicoproteínas (Montreuil y col., 1994).

4.1.1. GLICOSILACIÓN DE TIPO N

La cadena hidrocarbonada se une a través de un enlace *N*-glicosídico a un residuo de Asn presente en la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr. No obstante, la presencia de esta secuencia no garantiza la existencia de glicosilación. La frecuencia de glicosilación de estos sitios es variable y da lugar a una macroheterogeneidad de glicofomas (variabilidad en el grado de ocupación de los sitios). Por otro lado, puede existir una gran variedad de estructuras de oligosacáridos en un sitio particular, fenómeno conocido como microheterogeneidad (Restelli y Butler, 2002).

Existen tres categorías principales de estructuras de oligosacáridos tipo N, los cuales comparten la misma estructura básica (*core*) $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2\text{-Asn}$ pero difieren en sus ramificaciones exteriores (Fig. 8):

- Tipo alta manosa: posee dos a seis residuos de manosa (Man) adicionales unidos al *core*.
- Tipo complejo: contiene dos o más ramificaciones que poseen *N*-acetil-glucosamina (GlcNAc), galactosa (Gal) y ácido siálico (AS).
- Tipo híbrido: posee rasgos tanto del tipo alta manosa como del tipo complejo.

Un sustituyente común en las estructuras de los *N*-glicanos es la fucosa (Fuc), unida ya sea al *core* interno (proximal) o a los residuos GlcNAc de las ramificaciones (periférica). Además se puede encontrar una GlcNAc bisectante unida al residuo Man central del *core* mediante un enlace β 1-4 (Kornfeld y Kornfeld, 1985).

La *N*-glicosilación es una modificación co-traducciona l que comienza con la síntesis de un precursor ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) sobre el lípido dolicol y su posterior transferencia en bloque al sitio Asn-X-Ser/Thr de la cadena polipeptídica naciente en el retículo endoplasmático (RE) catalizada por la enzima oligosacaril transferasa (OST). Posteriormente se produce el procesamiento de los oligosacáridos en el RE y en el aparato de Golgi mediante una serie de reacciones enzimáticas en las que participan glucosidasas, manosidasas y transferasas, para dar

lugar a las diferentes estructuras de oligosacáridos mencionadas anteriormente (Goochee y col., 1992; Spiro, 2002).

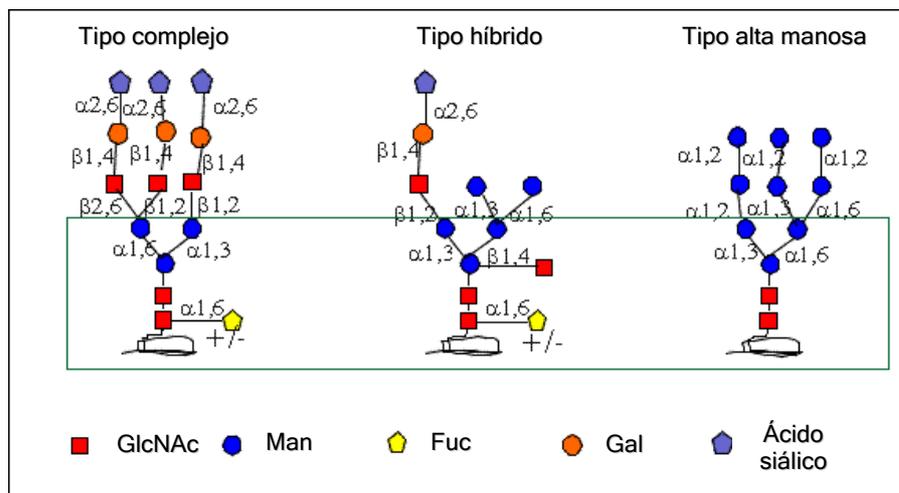


Fig. 8. Representación gráfica de la estructura de los oligosacáridos tipo N. Los oligosacáridos tipo complejo, alta manosa e híbrido comparten un *core* pentasacárido Man₃GlcNAc₂ (delimitado por la línea verde). GlcNAc: *N*-acetil-glucosamina, Man: manosa, Fuc: fucosa, Gal: galactosa.

4.1.2. GLICOSILACIÓN DE TIPO O

La cadena hidrocarbonada se une mediante un enlace *O*-glicosídico a una Ser o Thr de la proteína. Debido a que no se ha podido determinar una secuencia consenso, cualquier Ser o Thr es un sitio potencial para la *O*-glicosilación. No obstante, se ha observado que los residuos *O*-glicosilados se encuentran a menudo en regiones del péptido que contienen una alta proporción de Ser, Thr y Pro. En general, el residuo Thr se glicosila más eficientemente que Ser (Rudd y Dwek, 1997; Van den Steen y col., 1998).

Los oligosacáridos de tipo O más comúnmente encontrados son los del tipo mucina. Se han identificado ocho estructuras básicas, pero la mayoría de las cadenas O en glicoproteínas de membrana o suero se basan en la unión de una Gal al C3 de la *N*-acetil-galactosamina (GalNAc) que se encuentra unida al oxígeno de la Ser/Thr, donde el ácido siálico se puede adicionar mediante un enlace α -2-3 a la Gal o α -2-6 a la GalNAc (Hounsell y col., 1996).

La *O*-glicosilación es un evento post-traduccional; es decir, que se produce luego del plegamiento proteico, por lo que sólo las Ser/Thr que se encuentran expuestas serán glicosiladas. El proceso se inicia mediante la adición de un residuo de GalNAc a la Ser/Thr catalizada mediante una GalNAc transferasa, a partir de una molécula de dicho azúcar activada con uridina-5'-difosfato (UDP-GalNAc). La elongación requiere de la adición enzimática secuencial de residuos de monosacáridos directamente a la proteína (Opdenakker y col., 1993).

4.2. ROL BIOLÓGICO DE LOS OLIGOSACÁRIDOS DE GLICOPROTEÍNAS

Existen muchas teorías acerca de la función de los carbohidratos en los diferentes tipos de glicoconjugados, pero ninguna de ellas ha demostrado ser de aplicación universal (Varki, 1993). Los oligosacáridos poseen un marcado efecto sobre diversas propiedades biológicas de

las proteínas que los contienen, incluyendo su solubilidad, estabilidad (resistencia a proteasas y a degradación térmica), antigenicidad, inmunogenicidad, actividad biológica, interacción entre células, farmacocinética y vida media en plasma (Goochee y col., 1992).

4.2.1. EFECTOS SOBRE LA SOLUBILIDAD Y ESTABILIDAD

La presencia de oligosacáridos a menudo promueve la solubilidad y evita la agregación de proteínas. Por ejemplo, la remoción completa de los *O*-glicanos del factor estimulante de colonias de granulocitos humano (hG-CSF) resulta en un alto nivel de autoagregación, lo cual conduce a su inactivación biológica (Oh-Eda y col., 1990). Los oligosacáridos podrían contribuir al aumento de la solubilidad de las glicoproteínas mediante el enmascaramiento de grupos hidrofóbicos de su superficie.

La estabilidad de una glicoproteína *in vivo* generalmente es función de su resistencia al ataque por proteasas. Los carbohidratos pueden ejercer un rol en la protección al ataque de enzimas proteolíticas extracelulares, probablemente mediante el encubrimiento de sitios de clivaje. La presencia de ácidos siálicos terminales protege a la eritropoyetina (EPO) (Goldwasser y col., 1974), al activador del plasminógeno tisular (tPA) (Wittwer y Howard, 1990) y a los IFNs (Cantell y col., 1992) del ataque proteolítico. Por otro lado, en algunos casos, la remoción total de oligosacáridos de las proteínas lleva a una disminución de su estabilidad térmica. Por ejemplo, la remoción enzimática de los ácidos siálicos de la EPO aumenta su velocidad de desnaturalización a 70°C (Goochee y col., 1992; Jenkins y Curling, 1994; Chamorey y col., 2002).

4.2.2. EFECTOS SOBRE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

En muchos casos, los carbohidratos de las glicoproteínas poseen un efecto significativo sobre su actividad biológica específica. Existen ejemplos en los cuales la ausencia de oligosacáridos produce un aumento de la actividad biológica específica *in vitro* (por ejemplo, la prolactina aglicosilada posee una mayor afinidad de unión por el receptor y una mayor capacidad de estimular la proliferación celular que su contraparte glicosilada) (Markoff y col., 1988) y otros donde la carencia de azúcares produce una disminución de dicha actividad (por ejemplo, la remoción de ácido siálico elimina la actividad coagulante del Factor IX) (Chavin y Weidner, 1984).

Para muchas proteínas, una completa glicosilación equivale a una actividad biológica específica máxima, aunque existen muchas instancias donde el estado de glicosilación no posee un gran impacto sobre la actividad biológica de una proteína *in vitro*. Por ejemplo, aunque la EPO humana desialidada muestra una reducción de 1.000 veces en su actividad biológica *in vivo* comparada con su forma nativa, el incremento de actividad que se observa *in vitro* es menos notorio (Goochee y col., 1992; Jenkins y Curling, 1994).

4.2.3. EFECTOS SOBRE LA ANTIGENICIDAD E INMUNOGENICIDAD

La glicosilación contribuye a las propiedades antigénicas de las proteínas de diferentes maneras, ya sea inactivando el epítipo peptídico (enmascaramiento de sitios antigénicos) o formando parte de la estructura reconocida por el anticuerpo. Algunas cadenas de oligosacáridos pueden ser antigénicas por sí mismas y generar anticuerpos anti-carbohidratos, mientras que otras necesitan del entorno proteico para ser reconocidas (Lisowska, 2002).

Los efectos de los azúcares sobre la inmunogenicidad de las proteínas, es decir, sobre la capacidad de estimular una respuesta inmune, son menos claros. No se han detectado anticuerpos anti-EPO en pacientes a los cuales se les ha administrado dicha hormona producida en células CHO (*Chinese Hamster Ovary*), cuya secuencia aminoacídica es idéntica a la de la proteína nativa pero posee características distintivas en su porción glicosídica. Por otro lado, las proteínas que son normalmente glicosiladas pueden resultar inmunogénicas si son administradas en su forma no glicosilada (Goochee y col., 1992). De esta manera, se ha verificado la existencia de anticuerpos inducidos durante el tratamiento de patologías empleando las formulaciones no glicosiladas de IL-2, IFN- γ , GM-CSF y G-CSF (Revoltella y col., 1997; Wadhwa y col., 2000). Muchos de estos anticuerpos resultaron neutralizantes de la actividad biológica de las mencionadas citoquinas. En consecuencia, la selección de un huésped celular adecuado (como las células de mamífero) para la producción de citoquinas glicosiladas reduciría los riesgos del desarrollo de respuesta inmune de tipo humoral durante el empleo terapéutico de tales proteínas.

4.2.4. EFECTOS SOBRE LA FARMACOCINÉTICA Y *CLEARANCE IN VIVO*

Los oligosacáridos poseen un rol significativo en la definición de la velocidad de depuración (o *clearance*) de glicoproteínas *in vivo*, una propiedad crítica para la determinación de la eficacia de una proteína terapéutica. La actividad biológica específica evaluada *in vitro* será de poca importancia si la proteína inyectada es eliminada rápidamente del sistema circulatorio. Por ejemplo, la actividad *in vitro* de la EPO aumenta cuando la misma es desialidada, pero la actividad *in vivo* disminuye considerablemente debido a su rápido *clearance* plasmático (Takeuchi y col., 1990).

Existen varios mecanismos de *clearance* circulatorio asociados con receptores de alta afinidad que reconocen los monosacáridos terminales de los carbohidratos de las glicoproteínas. El receptor de asialoglicoproteínas presente en hepatocitos se une a las glicoproteínas que exhiben una Gal o una GalNAc terminal, incluyendo los oligosacáridos complejos de tipo N desialidados, produciendo su eliminación de la circulación (Morell y col., 1971; Kawasaki y Ashwell, 1976). Se piensa que este mecanismo es el principal responsable de la rápida eliminación de la EPO desialidada. También existen receptores de manosa que depuran proteínas con alto contenido de manosa, como las producidas por células de levadura (Cumming, 1991).

Las proteínas humanas que poseen masas moleculares inferiores a 70 kDa son continuamente removidas de la circulación mediante filtración glomerular. La velocidad de filtración a través de los túbulos renales es sensible a la estructura terciaria de la proteína y a su masa molecular, y es inhibida por la presencia de cargas en la superficie. En glicoproteínas de bajo peso molecular, los oligosacáridos pueden prolongar la vida media en circulación a través del aumento del tamaño y de la carga superficial que aportan los ácidos siálicos (Goochee y col., 1992; Baenziger, 1996).

4.3. FACTORES QUE AFECTAN LA EFICIENCIA DE *N*-GLICOSILACIÓN DE PROTEÍNAS

A pesar de que todas las proteínas traducidas y secretadas en una célula son expuestas a la misma maquinaria de glicosilación, no todos los sitios potenciales de *N*-glicosilación son invariablemente ocupados. En efecto, se estima que no están glicosilados entre el 10% y el 30% de dichos sitios. La eficiencia de glicosilación depende de la disponibilidad de precursores unidos

al lípido dolicol, de la actividad de la OST y de la estructura primaria, secundaria y terciaria de la proteína (Kornfeld y Kornfeld, 1985).

El grado de ocupación de los sitios de *N*-glicosilación se encuentra altamente influenciado por la secuencia primaria de la proteína, particularmente por los aminoácidos que se encuentran cercanos o formando parte del tripéptido consenso Asn-X-Ser/Thr. La estructura del aminoácido central (X) del sitio consenso es un determinante importante de la eficiencia de glicosilación. Estudios realizados empleando mutagénesis sitio dirigida mostraron que la presencia de Pro bloquea completamente la glicosilación, y que secuencias conteniendo Trp, Asp, Glu y Leu son glicosiladas en forma ineficiente (Shakin-Eshleman y col., 1996). Otro factor que inhibe la glicosilación es la presencia de Pro inmediatamente después del sitio consenso. Asimismo, la presencia de Thr en la tercera posición de la secuencia consenso resulta en un grado de ocupación entre dos y tres veces superior con respecto a si esa misma posición se encuentra ocupada por Ser (Kasturi y col., 1995). Por otro lado, los sitios cercanos a ambos extremos de la proteína son glicosilados en forma menos eficiente. Estudios estadísticos indicaron que la frecuencia de tripéptidos Asn-X-Ser/Thr no glicosilados aumenta a medida que los mismos se acercan al extremo C-terminal de la proteína (Nilsson y von Heijne, 2000).

La estructura secundaria establecida para un gran número de glicoproteínas indica que alrededor de un 70% de las secuencias consenso se localizan en giros β , un 20% en láminas β y un 10% en hélices α . Si bien habitualmente la probabilidad de glicosilación no se encuentra influenciada por la estructura tridimensional final de la proteína, la conformación estructural del polipéptido naciente puede influenciar la accesibilidad del tripéptido consenso a la OST. Debido a que la *N*-glicosilación es un proceso co-traducciona, se piensa que la eficiencia de glicosilación resulta de una competencia entre la velocidad de plegamiento de la proteína y la adición del precursor unido al lípido dolicol (Rudd y Dwek, 1997; Jones y col., 2005).

La macroheterogeneidad y microheterogeneidad de glicoformas también se encuentra altamente influenciada por el tipo de célula huésped, su estado fisiológico y su ambiente externo (Jenkins y Curling, 1994).

4.4. PRODUCCIÓN DE GLICOPROTEÍNAS RECOMBINANTES EN CÉLULAS DE MAMÍFERO

Las células procariotas (principalmente *E. coli*) fueron los primeros sistemas empleados para la expresión de proteínas recombinantes. Estas células tienen la ventaja de poseer una rápida velocidad de crecimiento y altos niveles de expresión de proteínas recombinantes, pero carecen de la maquinaria de glicosilación, por lo que no son apropiadas para la producción de glicoproteínas. Recientemente, se ha reportado la existencia de un camino de *N*-glicosilación en *Campylobacter jejuni*, pero la estructura del *core* de oligosacáridos que se une a las proteínas es completamente diferente a la encontrada en células eucariotas (Kelly y col., 2006).

Una alternativa es el uso de eucariotas inferiores (levaduras, plantas o células de insecto) como sistemas de expresión. Estas células poseen el mismo mecanismo de síntesis de los *N*-glicanos en el RE que las células de mamífero, pero el procesamiento de los oligosacáridos diverge en el aparato de Golgi, rindiendo glicanos que difieren significativamente de los presentes en glicoproteínas humanas. De esta manera, el diferente grado de glicosilación podría influir sobre la antigenicidad y toxicidad terapéutica de dichas proteínas recombinantes (Dorr, 1993; Walsh y Jefferis, 2006).

Contrariamente, las células de mamífero pueden realizar los procesos necesarios para la expresión apropiada de glicoproteínas humanas recombinantes. Presentan la capacidad de

realizar un correcto plegamiento proteico y de sintetizar oligosacáridos de tipo N complejos, además de otras modificaciones post-traduccionales tales como carboxilación y fosforilación. Por otro lado, las proteínas sintetizadas son secretadas al medio de cultivo, por lo que la proteólisis es limitada y el proceso de purificación es más simple. Por estos motivos, las células de mamífero son el huésped de elección para la expresión de proteínas complejas glicosiladas, tales como muchas proteínas humanas de interés terapéutico. Una desventaja de este sistema es que su cultivo presenta mayor dificultad, costos superiores y los niveles de expresión celulares suelen ser bajos.

Las líneas celulares derivadas de hámster *Chinese Hamster Ovary* (CHO) y *Baby Hamster Kidney* (BHK) son las más utilizadas para la producción de glicoproteínas humanas recombinantes de uso terapéutico, ya que producen un perfil de glicofomas semejante al de las proteínas humanas, con algunas diferencias que han demostrado no ser inmunogénicas (Hauser, 1997; Savage, 1997; Restelli y Butler, 2002).

5. ESTRATEGIAS PARA DISMINUIR EL *CLEARANCE* DE PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS

El desarrollo de la tecnología de ADN recombinante en los años '70 marcó el inicio de la era biotecnológica moderna. La producción de proteínas terapéuticas representó la primera aplicación industrial verdadera de esta tecnología, con la aprobación de la insulina para uso médico en 1982. Actualmente, existen más de 100 proteínas biofarmacéuticas aprobadas y en pruebas clínicas para el tratamiento de muchas enfermedades, de las cuales la mayoría se encuadra dentro de la categoría de citoquinas y hormonas (Koths, 1995; Walsh, 2003).

Sin embargo, debido a que las proteínas naturales no han evolucionado para ser utilizadas como drogas, la ingeniería de proteínas se ha utilizado ampliamente para alterar muchas de sus propiedades, de manera de mejorar su eficacia, estabilidad y especificidad y disminuir su inmunogenicidad y *clearance* plasmático (Graddis y col., 2002; Marshall y col., 2003). En adición a las modificaciones destinadas a mejorar la farmacocinética y las propiedades fisicoquímicas de los fármacos proteicos, se han desarrollado estrategias para dirigir las citoquinas al sitio blanco de la enfermedad, mediante su conjugación con *carriers* selectivos o ligandos que se unen a receptores específicos (Rachmawati y col., 2004).

Las proteínas terapéuticas son generalmente administradas por vía parenteral, ya sea endovenosa, subcutánea o intramuscular. Una vez que han sido administradas, la eficacia y duración de su efecto biológico son gobernadas por su farmacocinética. La absorción y distribución de los compuestos biológicos se encuentran influenciadas por la vía de administración, por el tamaño molecular y la capacidad de unirse a las proteínas plasmáticas. Por otro lado, el metabolismo y la eliminación de las proteínas terapéuticas depende de su estructura (incluyendo la presencia de carbohidratos), tamaño, carga e hidrofiliidad/hidrofobicidad. Los mecanismos de *clearance* proteico incluyen filtración glomerular, excreción por bilis, unión a receptores y/o degradación enzimática (Baumann, 2006).

La mayoría de las proteínas terapéuticas posee una vida media en plasma extremadamente breve (aproximadamente 30 minutos). Si bien un rápido *clearance* plasmático puede considerarse beneficioso a los efectos de lograr una acción transitoria y reversible, la rápida eliminación de la proteína del torrente sanguíneo limita su eficacia clínica. Muchas investigaciones se centran en el diseño de drogas con mayor vida media y actividad biológica *in vivo*, con el objeto de disminuir la frecuencia de inyección y dosis del medicamento y así mejorar la calidad de vida de los pacientes. En general, las estrategias para alterar el *clearance* de

proteínas de bajo peso molecular (menos de 40 kDa) tienen como objetivo disminuir la filtración glomerular, ya sea mediante modificaciones químicas o genéticas (Sheffield, 2001).

5.1. MODIFICACIONES QUÍMICAS

5.1.1. ADICIÓN COVALENTE DE POLIETILENGLICOL (PEGILACIÓN)

La pegilación consiste en la conjugación del polímero polietilenglicol (PEG) a grupos reactivos de moléculas tales como polipéptidos, polisacáridos, polinucleótidos y pequeñas moléculas orgánicas en general. En el caso de polipéptidos, los sitios reactivos pueden ser seleccionados de la siguiente lista de aminoácidos: Lys, Cys, His, Arg, Asp, Glu, Ser, Thr, Tyr, grupo amino N-terminal y grupo carboxilo C-terminal, dependiendo del sistema de activación de la molécula de PEG. La vía más empleada de conjugación de proteínas con PEG ha sido la activación del PEG con grupos funcionales apropiados para la reacción con residuos de Lys y el grupo amino terminal de las mismas (Roberts y col., 2002).

La pegilación retarda el *clearance* de proteínas mediante el aumento de su tamaño molecular efectivo, que resulta en una evasión de la filtración glomerular. Además, las moléculas pegiladas frecuentemente exhiben un incremento de su solubilidad y una reducción de su inmunogenicidad y agregación. Una desventaja de esta tecnología es que generalmente resulta en una pérdida de actividad biológica de la proteína debido a la obstrucción de sitios activos que son esenciales para su acción. Los efectos de la adición de PEG sobre las propiedades de las proteínas dependen del sitio de unión, de las reacciones químicas utilizadas para generar el conjugado y del tamaño y la estructura (lineal o ramificada) de la molécula del polímero (Bailon y Berthold, 1998; Roberts y col., 2002).

La tecnología de pegilación se ha aplicado exitosamente en la preparación de numerosas proteínas terapéuticas, entre ellas dos formas farmacéuticas del hIFN- α 2 (PEG-Intron[®], Schering-Plough y PEGASYS[®], Hoffman La Roche, Inc.). El PEG-Intron[®] es un derivado del rhIFN- α 2b unido a una molécula de PEG de 12 kDa cuya vida media en plasma es 10 veces superior a la del rhIFN- α 2b sin modificar, reteniendo un 30% de su actividad biológica específica *in vitro* (Wang y col., 2000; Wang y col., 2002). El PEGASYS[®] consiste en una forma de rhIFN- α 2a conjugado con un polímero ramificado de PEG de 40 kDa y, si bien retiene sólo un 7% de la actividad biológica específica *in vitro*, su vida media en plasma es 70 veces superior a la de la proteína nativa (Bailon y col., 2001; Foser y col., 2003). Otras citoquinas pegiladas incluyen PEG-G-CSF (Neulasta[®], Amgen), aprobado para su uso clínico en el año 2002, PEG-IL-2, que se encuentra en fase I de ensayos clínicos, PEG-IL-6, PEG-TNF- α y PEG-GM-CSF, los tres en ensayos pre-clínicos en animales de experimentación (Rachmawati y col., 2004).

5.1.2. CONJUGACIÓN CON OTROS POLÍMEROS BIODEGRADABLES

Aunque la pegilación es considerada actualmente como una de las técnicas químicas más exitosas para prolongar el tiempo de residencia plasmática de proteínas terapéuticas, el desarrollo de nuevas moléculas poliméricas con mejores propiedades continúa siendo un tópico de intensa investigación. La adición covalente de dextrano (Sheffield, 2001), polivinil pirrolidona (PVP) (Rachmawati y col., 2004) y ácidos polisilícicos (Gregoriadis y col., 2005) se ha utilizado con los mismos fines pero en menor medida, rindiendo productos cuyas características se ven afectadas de manera similar a las de la adición de PEG.

5.1.3. *CROSS-LINKING* DE PROTEÍNAS

El *cross-linking* de proteínas consiste en entrecruzar una proteína pequeña con una proteína *carrier* de mayor masa molecular, con el objeto de aumentar el volumen molecular por encima del límite de la filtración glomerular. La proteína *carrier* por excelencia es la albúmina, la cual se ha empleado, por ejemplo, para disminuir entre 7 y 8 veces el *clearance* del rhG-CSF (Paige y col., 1995).

El *cross-linking* químico para formar homodímeros, trímeros y multímeros de proteínas se ha aplicado para la EPO, lográndose no sólo un aumento del tiempo de vida media en circulación sino también un incremento de su eficacia clínica en animales de experimentación (Sytkowski y col., 1998).

Otra tecnología que involucra el *cross-linking* con el objeto de modificar el *clearance* consiste en entrecruzar la proteína con un anticuerpo selectivo, de manera de dirigir el agente terapéutico hacia un lugar especificado por el antígeno que reconoce dicho anticuerpo, además de extender su vida media plasmática (Sheffield, 2001).

5.2. MODIFICACIONES GENÉTICAS

5.2.1. FUSIÓN DE PROTEÍNAS

Una desventaja del uso del *cross-linking* u otras modificaciones químicas para modular el *clearance* de proteínas es el hecho de que los productos son normalmente heterogéneos, lo cual complica la estandarización y el escalado de los procesos productivos. Por este motivo, se han desarrollado estrategias genéticas que consisten en fusionar los ADN copia (ADNc) de diferentes proteínas o dominios de proteínas para obtener una proteína de fusión recombinante de una única cadena. Las proteínas más empleadas son aquéllas que poseen un tiempo de vida medio prolongado, como la albúmina o la porción Fc de los anticuerpos. Esta estrategia ha sido aplicada para la obtención del Enbrel® (Amgen), una proteína de fusión empleada para el tratamiento de la artritis reumatoidea que está formada por el dominio extracelular del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) y el dominio Fc de una inmunoglobulina humana. El dominio Fc aumenta la vida media del TNFR a través de un aumento de su tamaño y de la mediación del reciclado por endosomas (Goldenberg, 1999). Las fusiones con albúmina han sido utilizadas para generar variantes de la proteína anticoagulante hirudina (Syed y col., 1997) y de IFN- α (Osborn y col., 2002).

5.2.2. GLICOINGENIERÍA

La glicoingeniería es una metodología que se basa en la modificación del contenido y/o la estructura de los carbohidratos de proteínas o glicoproteínas. Una de las ramas más importantes de esta tecnología consiste en añadir cadenas de oligosacáridos a una proteína blanco con el fin de prolongar su tiempo de vida media en plasma e incrementar, de esta manera, su actividad biológica *in vivo*. Esta estrategia tiene como fundamento la propiedad de los carbohidratos de modular la farmacocinética y la velocidad de *clearance* de glicoproteínas naturales, como se ha mencionado previamente. También se ha demostrado que la introducción de nuevos azúcares puede influenciar otras propiedades de la proteína como su estabilidad, solubilidad, bioactividad e inmunogenicidad (Sinclair y Elliot, 2005).

La glicosilación se puede realizar mediante conjugación química de monosacáridos u oligosacáridos a la proteína. Este sistema tiene la ventaja de ser fácilmente controlable, pero requiere de pasos adicionales en el proceso de producción (Rachmawatti y col., 2004).

Una alternativa que ha demostrado ser muy exitosa es la introducción de sitios potenciales de *N*-glicosilación (Asn-X-Ser/Thr) a la secuencia proteica mediante mutagénesis sitio dirigida del ADNc y su posterior expresión en sistemas de cultivo de células de mamífero, las cuales son capaces de producir oligosacáridos de tipo complejo muy similares a los encontrados en proteínas humanas (Elliot y col., 2003; Sinclair y Elliot, 2005). El principal desafío de esta estrategia radica en seleccionar mediante métodos racionales las posiciones aminoacídicas adecuadas para incorporar los sitios de *N*-glicosilación, con el fin de preservar las propiedades estructurales y funcionales de la proteína (Marshall y col., 2003).

Un ejemplo notable de la aplicación de esta tecnología es la darbopoyetina alfa o NESP (*novel erythropoiesis stimulating protein*), una forma hiperglicosilada de rhEPO que contiene dos sitios adicionales de *N*-glicosilación (Aranesp[®], Amgen). Comparada con la rhEPO, la darbopoyetina alfa posee un tiempo de vida media tres veces superior, una potencia biológica *in vivo* (medida como su capacidad para aumentar el hematocrito en ratones sanos) 13 veces mayor y puede ser administrada en forma menos frecuente para obtener la misma respuesta biológica. Si bien estas mutaciones disminuyen la actividad *in vitro* de la proteína, la actividad *in vivo* aumenta, por lo que se piensa que la mayor vida media de la darbopoyetina alfa posee un rol más importante en su eficacia *in vivo* que su afinidad por el receptor. La Aranesp[®] es la variante de rhEPO más efectiva para el tratamiento de pacientes con anemia asociada a problemas renales que ha sido aprobada hasta el momento (Egrie y Browne, 2001; Egrie y col., 2003; Elliot y col., 2003; Koury, 2003; Jelkmann, 2006).

Una variante de esta técnica reside en la adición de pequeños péptidos a los extremos de la proteína que contienen en su secuencia sitios potenciales de *N*-glicosilación, de manera de evitar realizar mutaciones de los aminoácidos que constituyen la secuencia proteica. Esta técnica se ha aplicado exitosamente a la hormona folículo estimulante (FSH, *follicle stimulating hormone*), obteniéndose una proteína con dos sitios adicionales de *N*-glicosilación en una extensión de su extremo N-terminal, que posee una vida media 3 veces superior a la de la proteína nativa, sin evidenciar alteraciones en su actividad biológica *in vitro* (Perlman y col., 2003).

La glicoingeniería no sólo ha sido aplicada a proteínas que ya contienen sitios de *N*-glicosilación (como la rhEPO y la hFSH), sino también a proteínas que poseen sólo sitios de *O*-glicosilación, como el ligando de Mpl (ligando regulador de la megacariocitopoyesis), y a moléculas sin carbohidratos, como la leptina (Elliot y col., 2003). En ambos casos, esta tecnología permitió aumentar la actividad biológica *in vivo* y la duración de su acción, haciendo de la glicoingeniería un método general factible de ser utilizado para mejorar la eficacia de una gran variedad de proteínas terapéuticas.

OBJETIVOS Y PLAN DE TESIS

El presente trabajo de tesis se centra en el diseño, producción y caracterización de muteínas de interferón- α 2b humano recombinante (rhIFN- α 2b) que presenten propiedades mejoradas en comparación con la proteína nativa, con el fin de aumentar su actividad biológica *in vivo* y, en consecuencia, su eficacia terapéutica. La glicoingeniería, en particular, la introducción de sitios potenciales de *N*-glicosilación en la secuencia aminoacídica del rhIFN- α 2b, fue la estrategia seleccionada para alcanzar los fines mencionados.

El objetivo primordial consiste en la mejora de las propiedades farmacocinéticas de la citoquina, considerando que el principal problema que reviste el uso clínico de la misma es su rápida eliminación de la circulación. De esta manera, se propone la adición de carbohidratos como metodología para obtener derivados de rhIFN- α 2b que exhiban una mayor vida media plasmática, lo cual potencialmente permitiría disminuir la frecuencia de administración, reduciendo los efectos secundarios indeseados y mejorando la calidad de vida del paciente. Asimismo, como se expuso anteriormente, los oligosacáridos poseen una marcada influencia sobre diversas propiedades biológicas de las proteínas que los contienen, por lo que la aplicación de esta tecnología podría conducir a la aparición de características beneficiosas adicionales.

Los objetivos generales y específicos planteados en este Plan de Tesis son los siguientes:

- 1- Desarrollo de técnicas para la cuantificación y valoración de la actividad biológica *in vitro* del rhIFN- α 2b y sus derivados.
- 2- Evaluación teórica de la modificación de aminoácidos del rhIFN- α 2b para introducir un número variable de sitios consenso de *N*-glicosilación (Asn-Xxx-Ser/Thr), con el objeto de obtener una alta probabilidad de glicosilación y, a su vez, conservar la actividad biológica de la citoquina.
- 3- Construcción de muteínas del rhIFN- α 2b con un número variable de sitios potenciales de *N*-glicosilación.
 - a) Aislamiento de la región codificante del hIFN- α 2b a partir de ADN genómico de leucocitos de sangre periférica humana.
 - b) Mutagénesis sitio-dirigida para introducir secuencias consenso de *N*-glicosilación en la citoquina.
 - c) Clonado del rhIFN- α 2b y sus análogos mutados en vectores para expresión en células eucariotas.
- 4- Expresión de las variantes del rhIFN- α 2b en células de mamífero.
 - a) Transfecciones transitorias de células CHO para evaluar la calidad de las diferentes variantes del rhIFN- α 2b.
 - b) Obtención de clones celulares estables productores del rhIFN- α 2b y de los análogos *N*-glicosilados que cumplan con los requisitos de elevada eficiencia de glicosilación y conservación de la actividad biológica *in vitro*.
 - c) Optimización de las condiciones de producción del rhIFN- α 2b y sus derivados mediante el cultivo de los clones seleccionados en condiciones de adherencia.
- 5- Puesta a punto de una tecnología de purificación del rhIFN- α 2b y sus derivados *N*-glicosilados mediante cromatografía de inmunoafinidad.

- 6- Caracterización de las muteínas *N*-glicosiladas del rhIFN- α 2b.
 - a) Evaluación de la farmacocinética en animales de experimentación utilizando diferentes vías de administración.
 - b) Estudio de la actividad biológica antitumoral *in vivo* en ratones inmunocomprometidos.
 - c) Análisis de la estabilidad frente a diferentes condiciones físicas y biológicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. REACTIVOS Y SOLUCIONES

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

2. LÍNEAS CELULARES, CEPAS BACTERIANAS Y CEPAS VIRALES

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

- CHO.K1 (Puck y col., 1958): obtenida de la Asociación Banco Argentino de Células (ABAC; Buenos Aires, Argentina). Es un clon de la línea celular CHO derivada de ovario de hámster chino adulto. Se empleó como huésped para la expresión de proteínas recombinantes.
- WISH (Hayflick, 1961): cedida gentilmente por el Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas “Dr. Julio I. Maiztegui” (Buenos Aires, Argentina). Es una línea derivada de tejido amniótico humano, susceptible a la infección con el virus de la estomatitis vesicular (VSV). Se utilizó para la puesta a punto de ensayos de valoración de la actividad biológica antiviral *in vitro* del rhIFN- α 2b.
- MDBK (*Madin-Darby Bovine Kidney*) (Madin y Darby, 1958): obtenida de la ABAC. Son células bovinas derivadas de riñón de un animal adulto normal, susceptibles a la infección con el virus VSV. Se utilizaron para la valoración biológica antiviral *in vitro* del rhIFN- α 2b.
- Daudi (Klein y col., 1968; Nadkarni y col., 1969): obtenida de la colección de cultivos del *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ; Braunschweig, Alemania). Es una línea celular humana derivada del linfoma de Burkitt, que se empleó para la valoración de la actividad biológica antiproliferativa *in vitro* del rhIFN- α 2b.
- PC-3 (Kaighn y col., 1979; Pan y col., 1999): obtenida de la colección de cultivos del DSMZ. Es una línea celular humana establecida a partir de un adenocarcinoma de próstata humano, capaz de formar tumores en ratones *nude*. Se empleó para los ensayos de actividad biológica *in vivo* del rhIFN- α 2b.
- Hibridomas productores de anticuerpos monoclonales (mAbs) anti-rhIFN- α 2b: se emplearon los clones denominados CA1A3, CA2G7, CA5E6, CA8B7, CA9C3, CB13A7, CB15D7, CB24D5, CB27H2, CB29D3 y CB33B3, obtenidos en el Laboratorio de Cultivos Celulares (LCC) (Casalis, 2004). Los mAbs producidos por cada clon fueron caracterizados en el LCC y evaluados para el desarrollo de

ensayos inmunoquímicos y para la purificación del rhIFN- α 2b por cromatografía de inmunoafinidad. En la Tabla II se describen algunas características de los mAbs del panel purificados por cromatografía de afinidad a proteína A a partir de ascitis murina.

Tabla II. Características de los mAbs anti-rhIFN- α 2b.

mAb	Concentración ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	Constante de afinidad (M^{-1})	Área del rhIFN- α 2b mapeada*
CA1A3	580	$(1,4 \pm 0,1) \cdot 10^{10}$	I
CA2G7	710	$(1,5 \pm 0,1) \cdot 10^8$	IIB
CA5E6	940	$(2,2 \pm 0,1) \cdot 10^8$	IIB
CA8B7	650	$(4,7 \pm 0,4) \cdot 10^7$	III
CA9C3	330	$(4,1 \pm 0,3) \cdot 10^7$	IV
CB13A7	200	$(1,5 \pm 0,1) \cdot 10^8$	IV
CB15D7	640	$(5,2 \pm 0,4) \cdot 10^8$	IIA
CB24D5	850	$(1,7 \pm 0,1) \cdot 10^7$	III
CB27H2	820	$(1,1 \pm 0,2) \cdot 10^9$	IIB
CB29D3	810	$(1,3 \pm 0,1) \cdot 10^8$	IIA
CB33B3	380	$(5,1 \pm 0,4) \cdot 10^7$	IIA

*Mediante ensayos de interacción competitiva entre pares de mAbs en presencia de rhIFN- α 2b, se determinaron cinco grupos de epitopes de la citoquina mapeados por el conjunto de mAbs constituyentes del panel (Casalis, 2004).

La cepa bacteriana *Escherichia coli* DH5 α F'1q fue cedida gentilmente por el Dr. Jorge Zorzópulos (Fundación Pablo Cassará, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina). Se empleó para el aislamiento y la amplificación de diferentes plásmidos. La presencia de ϕ 80lacZ Δ M15 permite la α -complementación en el extremo amino terminal de la β -galactosidasa.

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

3. MEDIOS DE CULTIVO

3.1. MEDIOS DE CULTIVO PARA CÉLULAS EUCARIOTAS

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

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

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

CHO.K1 *wild type* y recombinante:

Se empleó el medio de cultivo descrito por Kratje y Wagner (1992) (medio A), que consistió en una mezcla 1:1 (V/V) de los medios D-MEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Gibco B.R.L., EE.UU.) y Ham's-F12 (Gibco) suplementados con NaHCO_3 (Gibco) $2,441 \text{ g.l}^{-1}$, D(+)-glucosa anhidra (Sigma, EE.UU.) $1,183 \text{ g.l}^{-1}$, piruvato de sodio (Gibco) $0,110 \text{ g.l}^{-1}$, glutamina (Sigma) $1,100 \text{ g.l}^{-1}$, triptofano (Sigma) $0,027 \text{ g.l}^{-1}$, ácido aspártico (Sigma) $0,040 \text{ g.l}^{-1}$, serina (Sigma) $0,080 \text{ g.l}^{-1}$ y sulfato de gentamicina (Gibco) $0,050 \text{ mg.ml}^{-1}$. El medio A suplementado con el antibiótico geneticin (Gibco) $0,400 \text{ mg.ml}^{-1}$ se utilizó para llevar a cabo el procedimiento de selección de células transfectadas. Las concentraciones de SFB empleadas para suplementar el medio se indican en cada experiencia.

WISH y MDBK:

Se utilizó el medio MEM (*Minimum Essential Medium*, Gibco) suplementado con glutamina 2 mM, NaHCO_3 $2,200 \text{ g.l}^{-1}$, sulfato de gentamicina $0,050 \text{ mg.ml}^{-1}$ y SFB 10% (V/V).

Daudi:

Se empleó el medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con glutamina 2 mM, NaHCO_3 $1,500 \text{ g.l}^{-1}$, sulfato de gentamicina $0,050 \text{ mg.ml}^{-1}$ y SFB 10% (V/V).

PC-3:

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

Hibridomas:

Se empleó el medio D-MEM suplementado con NaHCO_3 $3,700 \text{ g.l}^{-1}$, piruvato de sodio 1 mM, sulfato de gentamicina $0,050 \text{ mg.ml}^{-1}$, tylosina (Sigma) $0,060 \text{ mg.ml}^{-1}$ y SFB 10% (V/V).

3.2. MEDIOS DE CULTIVO PARA CÉLULAS PROCARIOTAS

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

El medio LB (Luria-Bertani), compuesto de triptona (Sigma) 10 g.l^{-1} , extracto de levadura (Oxoid, Inglaterra) 5 g.l^{-1} y NaCl (Sigma) 10 g.l^{-1} se empleó para el crecimiento bacteriano en medio líquido. El caldo LB suplementado con ampicilina (Laboratorios Fabra, Argentina) $100 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ se utilizó para el crecimiento de clones resistentes a dicho antibiótico.

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

El medio agar LB suplementado con ampicilina $100 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$, 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal) (Invitrogen, EE.UU.) $26,7 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ e isopropil- β -D-tio-galactósido (IPTG) (Sigma) $0,66 \text{ mg.ml}^{-1}$ se utilizó para la selección de colonias blancas o azules en transformaciones bacterianas con plásmidos que permiten realizar la α -complementación de la β -galactosidasa.

4. SISTEMAS DE CULTIVO DE CÉLULAS

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

Se emplearon los siguientes sistemas de cultivo:

- Placas multipozos de poliestireno (Greiner, Alemania) de 96, 24, 12 y 6 pozos con una superficie de 0,4; 2,0; 5,0 y 9,6 cm² por pozo, respectivamente.
- Frascos T (Greiner) de 25, 75 y 175 cm² de superficie.
- Frascos T triples (Nunclon, EE.UU.) de 500 cm² de superficie.
- Botellas *Roller* (Nunclon) de 1.700 cm² (superficie extendida).

En todos los casos se mantuvo una relación constante de 0,4 ml de medio de cultivo por cada cm² de superficie, de acuerdo con lo establecido por Freshney (2000a).

Las líneas celulares que crecen adhiriéndose a una superficie sólida (sustrato) forman una monocapa. Para realizar subcultivos se las debe liberar de este sustrato por medios mecánicos o enzimáticos. Para tal fin, cuando los cultivos alcanzaron la confluencia, es decir cubrieron la totalidad de la superficie de los frascos donde se estaban desarrollando, se procedió a retirar el sobrenadante y lavar la monocapa con una solución de tripsina-EDTA, compuesta por tripsina (Gibco) 0,05% (P/V) y Na₂EDTA (Gibco) 0,02% (P/V) en *buffer* fosfato salino [PBS: KH₂PO₄ (Sigma) 0,60 g.l⁻¹, Na₂HPO₄ (Sigma) 0,78 g.l⁻¹, NaCl 8,80 g.l⁻¹, pH 7,4] durante 15 s a temperatura ambiente, con el fin de neutralizar la acción de factores antitripsina presentes en el SFB. Se respetó una relación de 20 µl de solución de tripsina-EDTA por cada cm² de superficie. Luego de eliminar la solución de lavado, se agregó nuevamente la misma proporción de la solución de tripsina-EDTA, dejándola actuar el tiempo necesario hasta lograr el desprendimiento completo de las células adheridas. Posteriormente, se adicionó el medio de cultivo suplementado con SFB para neutralizar la acción de la tripsina y se homogeneizó la suspensión celular.

Para las líneas celulares que crecen en suspensión, como es el caso de las células Daudi y los hibridomas, los subcultivos se efectuaron por simple dilución en el medio de cultivo fresco correspondiente.

Las células procariotas se cultivaron en estufa a 37°C, utilizando placas de Petri de 90 mm de diámetro para el cultivo en medio sólido y tubos cónicos de 50 ml o erlenmeyers de 250 ml y 500 ml para el cultivo en medio líquido.

5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS VIABLES, MUERTAS Y TOTALES

El recuento celular se realizó en cámara de Neubauer, estimando la proporción de células muertas por el método de exclusión con azul de tripán (Cook y Mitchell, 1989). Esta técnica se basa en el hecho de que las células viables no captan ciertos colorantes, mientras que las células muertas presentan una alteración de la membrana plasmática que permite el ingreso del colorante hacia su interior.

Con este fin, la suspensión celular se incubó durante 1 min con una solución de azul de tripán 0,4% (V/V) en PBS y posteriormente se sembró en la cámara de recuento, empleando diluciones convenientes de acuerdo con la densidad celular de la muestra. Se contaron las células vivas (refringentes) y las muertas (azules), contenidas en cada uno de los cuadrantes de los extremos.

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

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

La viabilidad del cultivo se determinó calculando el porcentaje de células viables con respecto a las totales (ecuación 2), teniendo en cuenta que la concentración de células totales (X_T) es la suma de la concentración de células muertas (X_M) y vivas (X_V).

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

6. CRIOPRESERVACIÓN DE LÍNEAS CELULARES DE MAMÍFERO

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

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

La conservación de las líneas y clones celulares se realizó en nitrógeno líquido, ya que a temperaturas de -196°C se observaron deterioros celulares mínimos (Green y col., 1967). Se empleó una técnica de enfriamiento gradual y escalonado desde temperatura ambiente hasta -196°C.

Para ello, una vez realizado el recuento, suspensiones celulares en fase de crecimiento exponencial se centrifugaron a 1.000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente en una centrífuga Eppendorf 5403, rotor 16A4-44 (Alemania). Se descartó el sobrenadante y el *pellet* celular se resuspendió en una solución de SFB y DMSO (Sigma) en una relación 95:5 (V/V), de manera de obtener una concentración de 1-2.10⁶ cél.ml⁻¹. La suspensión celular se distribuyó a razón de 1 ml por criotubo (Greiner) y fue enfriada gradualmente mediante la siguiente secuencia:

- a 4°C durante 1 h
- a -20°C durante 1 h
- a -70°C durante 30 min.

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

7. CRIOPRESERVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS

Para la conservación de bacterias, ya sea *wild type* o recombinantes, se procedió a cultivarlas durante 18 h a 37°C en medio LB o medio LB suplementado con ampicilina, respectivamente. Posteriormente, se tomaron 800 µl del cultivo y se le adicionaron 200 µl de glicerol (Merck, Alemania) estéril, homogeneizando para asegurar la distribución del glicerol. Finalmente, fueron conservadas a -70°C (Sambrook y col., 1989a).

8. REVITALIZACIÓN DE LÍNEAS CELULARES DE MAMÍFERO

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 que contenía 40 ml de medio de cultivo y se centrifugó a 1.000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Esta etapa se realizó con el objeto de eliminar el DMSO que es un reactivo tóxico para las células en cultivo. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* de células se resuspendió en un volumen de medio de cultivo adecuado. Finalmente, se realizó el recuento celular con el objeto de evaluar la recuperación y la viabilidad celular.

9. REVITALIZACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS

Para recuperar las bacterias congeladas, se obtuvo una pequeña porción de material con un ansa estéril a partir de la superficie del cultivo congelado e inmediatamente se realizó una estría en una placa de agar LB, para bacterias *wild type*, o en una placa de agar LB suplementado con ampicilina, para bacterias recombinantes. El criotubo se conservó nuevamente a -70°C y la placa se incubó a 37°C durante toda la noche. Posteriormente, se tomó una colonia bacteriana aislada y se amplificó el cultivo en medio LB según los requerimientos de la experiencia a realizar (Sambrook y col., 1989a).

10. MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DEL rhIFN- α 2b

Antes de realizar cualquier manipulación genética sobre las células de mamífero para que expresen el rhIFN- α 2b y sus diferentes variantes mutadas, se procedió a desarrollar métodos simples, rápidos y confiables para la determinación de la citoquina.

10.1. DESARROLLO DE DIFERENTES ELISAS

Para la cuantificación del rhIFN- α 2b presente en los sobrenadantes de cultivo y en las distintas etapas del proceso de purificación, se empleó un panel de 11 mAbs anti-rhIFN- α 2b (CA1A3, CA2G7, CA5E6, CA8B7, CA9C3, CB13A7, CB15D7, CB24D5, CB27H2, CB29D3, CB33B3), purificados por afinidad a proteína A a partir de ascitis murina, y un suero policlonal de conejo anti-rhIFN- α 2b (suero C7). Ambos reactivos, disponibles en el LCC, fueron obtenidos empleando el rhIFN- α 2b de origen bacteriano como inmunógeno.

Se plantearon dos diseños diferentes de ELISAs: ELISA *sandwich* y ELISA de competición.

10.1.1. ELISA SANDWICH

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

Se evaluaron todos los mAbs del panel como Igs de captura de la citoquina. Con el fin de comparar los resultados obtenidos, para cada uno de estos ensayos se determinaron los siguientes parámetros: límite de detección, rango de linealidad y sensibilidad. El límite de detección se define como la mínima cantidad del inmunorreactante que puede detectar el sistema y se calculó como la concentración de citoquina correspondiente al valor de absorbancia determinado mediante la ecuación 3 (para un intervalo de confianza del 95%), donde $\bar{X}_{(-)}$ es el promedio de absorbancia del control evaluado en ausencia de Ag (control negativo) y $SD_{(-)}$ es la desviación estándar. La sensibilidad es el cambio en la respuesta por cada cambio de la cantidad de reactante y se calculó como la pendiente de la curva dosis-respuesta en la zona de linealidad.

$$A_{\text{límite de detección}} = \bar{X}_{(-)} + 3 \times SD_{(-)} \quad (3)$$

Metodología:

- 1- Sensibilización: Placas de poliestireno de fondo plano de 96 pozos (Greiner) fueron sensibilizadas con 100 μl de mAb de captura 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (100 ng por 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 toda la noche a 4°C.
- 2- Bloqueo: El bloqueo de los sitios de interacción inespecífica se realizó con 200 μl por pozo de solución de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma) 1% (P/V) en PBS (solución de bloqueo). Se incubó durante 1 h a 37°C.
- 3- Primera incubación: En los pozos correspondientes se agregaron 100 μl de diluciones sucesivas 1:2 del estándar de rhIFN- α 2b de origen bacteriano (Protech Pharma S.A., Argentina) en solución de BSA 0,1% (P/V) en PBS con el agregado de Tween 20 (USB Corporation, EE.UU.) 0,05% (V/V) (solución diluyente), desde 20 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ hasta 0,0098 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ para un grupo de mAbs, y desde 1.000 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ hasta 0,488 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ para otro grupo de anticuerpos. En el caso de procesarse muestras, las mismas se ensayaron realizando diluciones seriadas al medio, de manera de poder compararlas con el estándar en el rango de linealidad de la curva. Se incubó durante 1 h a 37°C.
- 4- Segunda incubación: Se adicionaron 100 μl de suero de conejo C7 anti-rhIFN- α 2b en una dilución 1:1.000 preparada en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37°C.
- 5- Tercera incubación: Se agregaron 100 μl de anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo conjugados con la enzima peroxidasa (DAKO, Dinamarca) en una dilución 1:2.000 en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37°C.
- 6- 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, con el agregado de *o*-fenilendiamina (OPD, Sigma) en una concentración de 0,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (solución de revelado). Se agregaron 100 μl de solución de revelado por pozo y, luego de 15 min de incubación en oscuridad a temperatura ambiente, la

reacción se detuvo mediante el agregado de 50 μl de H_2SO_4 2N. La lectura del color generado se efectuó a una $\lambda=492$ nm en un lector de placas de microtitulación (Labsystems Multiskan MCC/340, Finlandia).

7- Controles:

Se realizaron dos tipos de controles:

- Sin mAb de captura, para evaluar el posible reconocimiento inespecífico entre el rhIFN- α 2b y la proteína de bloqueo. Para ello, durante la etapa de sensibilización, se reemplazó el mAb por el agregado de 100 μl de solución de sensibilización, continuando posteriormente con las siguientes etapas del ensayo.
- Sin Ag soluble (rhIFN- α 2b), para evaluar la posible unión inespecífica de los reactivos (control negativo). Para ello, durante la primera incubación, se reemplazó el Ag por el agregado de 100 μl de solución diluyente y se continuó con las siguientes etapas del ensayo.

8- Cuantificación:

Se graficaron los valores de absorbancia en función de las correspondientes concentraciones de rhIFN- α 2b y de las diluciones en escala logarítmica para el estándar y las muestras, respectivamente. La concentración de las muestras se determinó utilizando el ensayo de rectas paralelas (Milano, 2001).

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

10.1.2. ELISA DE COMPETICIÓN

Este ensayo se basa en la competición entre un Ag inmovilizado en fase sólida con el mismo Ag en fase líquida por su unión a un mAb en solución. Posteriormente, se mide la interacción remanente en fase sólida agregando un segundo anticuerpo anti-especie murina conjugado con una enzima que catalizará, *a posteriori*, la transformación de su sustrato incoloro en una sustancia coloreada.

Se evaluaron todos los mAbs del panel como Igs para realizar la competición. En este caso, el límite de detección se calculó como la concentración de Ag correspondiente a un valor de absorbancia determinado empleando la ecuación 4 (para un intervalo de confianza del 95%), donde $\bar{X}_{(100\%)}$ es el promedio de absorbancia del control de 100% de unión del mAb al Ag inmovilizado en fase sólida en ausencia de Ag soluble y $SD_{(100\%)}$ es la desviación estándar.

$$A_{\text{límite de detección}} = \bar{X}_{(100\%)} - 3 \times SD_{(100\%)} \quad (4)$$

Metodología:

1- Sensibilización:

Placas de poliestireno de fondo plano de 96 pozos fueron sensibilizadas con 100 μl de rhIFN- α 2b no glicosilado (Protech Pharma S.A.) $0,5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (50 ng por pozo) diluido en solución de sensibilización. Se incubó durante 1 h a 37°C y toda la noche a 4°C .

- 2- Bloqueo: El bloqueo de los sitios de interacción inespecífica se realizó con 200 μl por pozo de solución de bloqueo. Se incubó durante 1 h a 37°C.
- 3- Competición *in situ*. En los pozos correspondientes se agregaron 50 μl de diluciones sucesivas 1:2 del estándar de rhIFN- α 2b en solución diluyente desde 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ hasta 0,0049 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. En el caso de procesarse muestras, las mismas se ensayaron realizando diluciones seriadas al medio, de manera de poder compararlas con el estándar en el rango de linealidad de la curva.
Posteriormente, se adicionaron 50 μl de solución del correspondiente mAb purificado a cada pozo de la placa de microtitulación, utilizando una dilución apropiada del mismo. Se seleccionó aquella dilución de mAb que proporcionó una señal colorimétrica correspondiente al 50% de la máxima absorbancia alcanzada en ensayos de titulación mediante técnica de ELISA específico indirecto. La reacción de competición se llevó a cabo durante 1 h a 37°C.
- 4- Segunda incubación: Se agregaron 100 μl de anticuerpos de conejo anti-inmunoglobulinas murinas conjugados con la enzima peroxidasa (DAKO) en una dilución 1:1.000 en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37°C.
- 5- Reacción reveladora: Se repitió el procedimiento indicado en 10.1.1.
- 6- Controles: Se realizaron dos tipos de controles:
- Se evaluó el 100% de unión de cada mAb al Ag inmovilizado en la placa de microtitulación, en ausencia de Ag soluble. Para ello, durante la etapa de competición *in situ*, se reemplazó el estándar y/o la muestra por el agregado de 50 μl de solución diluyente y, posteriormente, se adicionaron 50 μl de la solución de mAb. Luego se continuó con las siguientes etapas del ensayo.
 - Control negativo en ausencia de Ag soluble y de mAb. Para ello, durante la etapa de competición *in situ*, se adicionaron 100 μl de solución diluyente en lugar de Ag competidor y mAb, continuando con las etapas posteriores del ensayo.
- 7- Cuantificación: Se realizó según lo indicado en 10.1.1.

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

10.1.3. EVALUACIÓN DE DIFERENTES ENTORNOS PROTEICOS (EFECTO MATRIZ)

Un problema común que se presenta en los inmunoensayos es la influencia que ejercen los componentes de la solución en la que se encuentra la molécula a cuantificar a nivel de su reconocimiento por parte del anticuerpo.

Para analizar la influencia del entorno en la cuantificación del rhIFN- α 2b mediante la técnica de ELISA *sandwich* (sección 10.1.1), se prepararon curvas de dilución de la citoquina en diferentes medios diluyentes:

- BSA 0,1% (P/V) en PBS - Tween 20, 0,05% (V/V)
- BSA 5% (P/V) en PBS - Tween 20, 0,05% (V/V)

- SFB 5% (V/V) en PBS - Tween 20, 0,05% (V/V)
- PBS
- Medio de cultivo A suplementado con SFB 0,1% (V/V)
- Medio de cultivo A suplementado con SFB 5% (V/V)
- Medio de cultivo A condicionado por el crecimiento de células CHO.K1
- Medio de cultivo A condicionado por el crecimiento de células BHK-21

10.2. CROMATOGRAFÍA EN FASE REVERSA

La cuantificación del rhIFN- α 2b y sus diferentes variantes mutadas purificadas mediante cromatografía de inmunoafinidad (sección 17), se realizó mediante cromatografía en fase reversa, empleando una columna C4 Júpiter™ (Phenomenex, EE.UU.) de 4,15 ml (250 mm x 4,6 mm), rellena con partículas de 5 μ m de diámetro y un tamaño de poro de 300 Å. La cromatografía se realizó a temperatura ambiente en un cromatógrafo líquido de alta *performance* analítico (Alliance HPLC System, Waters, EE.UU.), empleando un flujo de 1 ml.min⁻¹. La columna se equilibró con una solución acuosa de ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% (V/V) en acetonitrilo (ACN) al 20% (V/V). Luego de la inyección automática de 100 μ l de muestra se utilizó el perfil de elución que se describe en la Tabla III, realizando la detección de la proteína a una λ =210 nm. La integración de las áreas de los picos se realizó empleando el *software* Empower™ 2 Chromatography Data Software (Waters).

Tabla III. Perfil de elución HPLC-C4 para la cuantificación del rhIFN- α 2b y sus derivados purificados.

Solvente A: TFA (J. T. Baker, EE.UU.) 0,1% (V/V) en agua						
Solvente B: TFA 0,1% (V/V) en ACN (J. T. Baker) 100% (V/V)						
Tiempo (min)	0	10	70	75	80	90
% Solvente B	20	20	80	100	100	20

10.3. ESPECTROFOTOMETRÍA

La cuantificación de muestras de variantes de rhIFN- α 2b purificadas de elevada concentración se llevó a cabo por medición espectrofotométrica. De esta manera, conociendo su coeficiente de extinción, el cálculo de la concentración se realizó por lectura de absorbancia a λ =280 nm, utilizando la siguiente ecuación:

$$C(\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}) = \frac{A_{280 \text{ muestra}} - A_{280 \text{ blanco}}}{0,924 (\text{ml}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}) \times L (\text{cm})} \quad (5)$$

donde C es la concentración de rhIFN- α 2b; A, la absorbancia a λ =280 nm; 0,924, la absorptividad específica de rhIFN- α 2b no glicosilado a λ =280 nm, y L, la longitud de paso óptico (1 cm).

Se empleó un espectrofotómetro UV-visible (Ultrospec 2000, GE Healthcare) y cubetas de cristal de cuarzo.

11. MÉTODOS DE VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA *IN VITRO* DEL rhIFN- α 2b

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

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

11.1. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA ANTIVIRAL

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

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

En primera instancia, se establecieron las condiciones óptimas del ensayo (Familletti y col., 1981; Rubinstein y col., 1981), con el fin de determinar el tiempo de incubación de las células MDBK en presencia del IFN antes del agregado del virus. Para ello, se utilizó el estándar internacional de la OMS para el rhIFN- α 2b producido en *E. coli* obtenido del *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC 95/566).

La metodología desarrollada fue la siguiente:

- 1- En placas de cultivo estériles de fondo plano de 96 cavidades se colocaron 100 μ l por pozo de sucesivas diluciones 1:2 del estándar de rhIFN- α 2b en medio MEM suplementado con SFB 10% (V/V) (medio de crecimiento), desde una concentración de actividad de 40 UI. ml^{-1} hasta 0,625 UI. ml^{-1} . El estándar se procesó por triplicado para cada tiempo de incubación ensayado.
- 2- La línea celular MDBK fue cultivada en medio de crecimiento. Cuando el cultivo se encontraba en fase de crecimiento exponencial, las células se cosecharon, se contaron y se resuspendieron de manera de obtener una densidad celular de $4 \cdot 10^5$ cél. ml^{-1} .
- 3- Posteriormente, se adicionaron 100 μ l de suspensión celular en cada cavidad ($4 \cdot 10^4$ células por pozo) y se incubó en estufa a 37°C durante tiempos variables. Una placa se procesó sin incubar previamente las células con IFN antes del agregado del

- virus y otras tres se procesaron mediante incubación de las células con IFN previo al agregado del virus durante 2, 4 y 6 h, respectivamente.
- 4- Finalmente, se agregaron 50 μl de una dilución apropiada del virus VSV en medio de crecimiento en cada cavidad de la placa y se incubó durante 24 h. Se definió como dilución apropiada del virus VSV aquella que permitió desarrollar una acción citopática sobre células MDBK no tratadas con IFN del 100% en 24 h.
 - 5- Para revelar el ensayo, se eliminó el sobrenadante de cultivo por inversión de la placa (volumen final 250 μl por pozo), se escurrió y se adicionaron 50 μl por pozo de una solución de cristal violeta 0,75% (P/V) en metanol 40% (V/V), incubándose durante 15 min a 37°C. Posteriormente, se eliminó el colorante y se realizaron lavados con agua destilada hasta verificar ausencia del colorante en los lavados. Para disolver el colorante fijado, se agregaron 250 μl de ácido acético 20% (V/V) en cada cavidad y se homogeneizó. La lectura del color generado se efectuó a una $\lambda=540$ nm en un lector de placas de microtitulación.
 - 6- Se realizaron dos tipos de controles por triplicado:
 - En ausencia de IFN y de virus, para evaluar máxima proliferación celular cuando no se produce infección viral. Para ello, se reemplazaron los 100 μl de la dilución del rhIFN- α 2b y los 50 μl de la dilución del virus por 150 μl de medio de crecimiento.
 - En ausencia de IFN, para evaluar el efecto del virus sobre las células (control de lisis). Para ello, se adicionaron 100 μl de medio de crecimiento en lugar de la dilución del rhIFN- α 2b.
 - 7- Se graficaron los valores de absorbancia en función de las correspondientes concentraciones del rhIFN- α 2b para cada tiempo de incubación. Finalmente, se seleccionó la mejor condición del experimento en base al cálculo de parámetros como límite de detección y sensibilidad.

En segundo lugar, se evaluó otro ensayo de características muy similares al anterior, pero con la diferencia de que las células son sembradas el día previo a la incubación con el IFN, a fin de obtener una monocapa celular antes de realizar las diluciones del estándar. Esta variación del primer ensayo se realizó con el objeto de partir de una población celular más homogénea, de manera de minimizar la variabilidad de la técnica. Por otro lado, entre cada etapa se eliminó el sobrenadante de la placa.

La metodología desarrollada fue la siguiente:

- 1- La línea celular MDBK fue cultivada en medio de crecimiento. Cuando el cultivo se encontraba en fase de crecimiento exponencial, las células se cosecharon, se contaron y se resuspendieron de manera de obtener una densidad celular de $2,5 \cdot 10^5$ cél. ml^{-1} . Se sembraron 100 μl de esta suspensión celular en cada cavidad de una placa de cultivo estéril de 96 pozos ($2,5 \cdot 10^4$ células por pozo) y se incubó durante 24 h a 37°C.
- 2- Se eliminó el sobrenadante por inversión de la placa, se escurrió y se colocaron 100 μl por pozo de sucesivas diluciones 1:2 del estándar del rhIFN- α 2b en medio MEM suplementado con SFB 2% (V/V) (medio de ensayo), desde una concentración de actividad de 20 UI. ml^{-1} hasta 0,156 UI. ml^{-1} , incubándose durante 6 h.
- 3- Se eliminó nuevamente el sobrenadante por inversión de la placa y se realizaron dos lavados con 100 μl de medio de ensayo. Finalmente, se escurrió y se colocaron 100 μl de una dilución apropiada del virus VSV en medio de ensayo en cada cavidad, incubándose durante 24 h.

- 4- El revelado se realizó siguiendo el paso 5 del protocolo anterior.
- 5- Se realizaron los mismos controles que para el protocolo anterior, con la diferencia de que se empleó medio de ensayo en lugar del medio de crecimiento.
- 6- Se graficaron los valores de absorbancia en función de las correspondientes concentraciones del rhIFN- α 2b y se calcularon los parámetros límite de detección y sensibilidad.

En tercer lugar, este último ensayo se llevó a cabo utilizando la línea celular WISH, con el objetivo de evaluar la influencia de la línea celular sobre la respuesta antiviral del rhIFN- α 2b, y seleccionar el ensayo más adecuado para su valoración biológica antiviral.

11.2. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA ANTIPROLIFERATIVA

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

El procedimiento básico consiste en sembrar un determinado número de células Daudi en placas de microtitulación e incubarlas con diluciones seriadas del rhIFN- α 2b durante un determinado tiempo. Posteriormente, mediante un método colorimétrico se mide la proliferación celular, poniendo en evidencia la presencia de enzimas deshidrogenasas que se encuentran en las células metabólicamente activas y cuya actividad se relaciona en forma directa con la cantidad de células viables presentes en el cultivo (Nederman y col., 1990).

Con este fin, se empleó el *kit Cell Titer 96TM AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay* (Promega, EE.UU.), el cual se compone de dos reactivos:

- **MTS** [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxi-fenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium] 2 mg.ml⁻¹.
- **PMS** [metasulfato de fenazina] 0,92 mg.ml⁻¹.

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

Inicialmente, se optimizaron las condiciones del bioensayo, utilizando el estándar internacional de la OMS para el rhIFN- α 2b producido en *E. coli* (NIBSC 95/566), para determinar:

- El rango de concentraciones del rhIFN- α 2b.
- El inóculo inicial de células Daudi: se ensayaron 5.10³, 1.10⁴ y 1,5.10⁴ células por pozo.
- El tiempo de incubación de las células Daudi con el rhIFN- α 2b: se evaluaron 72 y 96 h de incubación.

Posteriormente, el protocolo optimizado se utilizó para determinar la potencia biológica antiproliferativa de preparaciones de rhIFN- α 2b. El estándar, las muestras y los controles se procesaron por triplicado, utilizando el protocolo que se describe a continuación:

- 1- En placas estériles de fondo plano de 96 cavidades se colocaron 50 μ l por pozo de sucesivas diluciones 1:2 del estándar de rhIFN- α 2b en medio RPMI suplementado con SFB 10% (V/V), desde una concentración de actividad de 100 UI.ml⁻¹ hasta 0,78 UI.ml⁻¹.

Las muestras se ensayaron en iguales condiciones, realizando una dilución inicial adecuada que permitió compararlas con el estándar en el rango de linealidad de la curva dosis-respuesta.

- 2- La línea celular Daudi fue cultivada en medio RPMI suplementado con SFB 10% (V/V). Cuando la suspensión celular se encontraba en fase de crecimiento exponencial, las células se cosecharon y se centrifugaron a 1.000 rpm durante 10 min. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en el mismo medio de cultivo, preparando una suspensión de 1.10^5 cél.ml⁻¹.
- 3- Posteriormente, se adicionaron 50 µl de suspensión celular en cada cavidad (5.10^3 células por pozo), incubándose durante 96 h en estufa a 37°C.
- 4- Transcurrido el tiempo de incubación, se agregaron 20 µl por cavidad del reactivo de color, preparado en el momento mezclando 2 ml de solución de MTS con 100 µl de solución de PMS por cada placa. Se incubó durante 5 h a 37°C. La absorbancia del cromógeno se midió a una $\lambda=492$ nm contra lectura de fondo de placa a $\lambda=690$ nm.
- 5- Se realizaron dos tipos de controles:
 - Para evaluar la máxima proliferación celular en ausencia de rhIFN- α 2b. Para ello, se reemplazaron los 50 µl de la dilución de rhIFN- α 2b por 50 µl de medio RPMI suplementado con SFB 10% (V/V) y se adicionaron 50 µl de la suspensión celular.
 - Para evaluar los reactivos utilizados durante el desarrollo de la reacción colorimétrica. Para ello, se reemplazaron los 50 µl de la dilución de rhIFN- α 2b y los 50 µl de suspensión celular por 100 µl de medio RPMI suplementado con SFB 10% (V/V).
- 6- Se graficaron los valores de absorbancia en función de las correspondientes concentraciones de actividad del rhIFN- α 2b y de las diluciones en escala logarítmica para el estándar y las muestras, respectivamente. La concentración de actividad de las muestras se determinó mediante comparación con el estándar utilizando el *test* de rectas paralelas.

12. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE GLICOFORMAS DEL rhIFN- α 2b Y SUS VARIANTES MUTADAS

12.1. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) Y *WESTERN BLOT*

Con el objeto de analizar la masa molecular y el patrón de isoformas del rhIFN- α 2b y sus variantes mutadas, se utilizó el ensayo de *Western blot*, el cual consistió básicamente en tres pasos: separación electroforética de los componentes de una muestra en un gel de poliacrilamida, electrotransferencia de los mismos a una membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF) e identificación de las moléculas transferidas por interacción con anticuerpos específicos.

La electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) se desarrolló siguiendo esencialmente el método descrito por Laemmli (1970), utilizando para el armado de los geles el sistema de electroforesis modular vertical *Mini-Protean 3* (Bio-Rad, EE.UU.). Todos los geles fueron ensayados en condiciones desnaturalizantes, agregando el detergente iónico SDS (SDS-PAGE), en presencia de un agente reductor de enlaces disulfuro (β -mercaptoetanol). Para ello, se utilizó un gel de apilamiento cuya concentración de acrilamida/bisacrilamida fue del 5% (P/V) y un gel de separación polimerizado con una concentración de acrilamida/bisacrilamida

del 15% (P/V). Las muestras se mezclaron con una solución de Tris 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 preparación de muestras) en proporción 3:1. Las muestras fueron incubadas a 100°C durante 3 min y sembradas directamente sobre el gel de apilamiento. La corrida electroforética se llevó a cabo a voltaje constante de 200 V, sumergiendo el módulo en baño de hielo, hasta que el frente de corrida alcanzó 0,5 cm del borde inferior del gel de separación.

Luego de la electroforesis se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF (Bio-Rad), empleando el mismo equipo de Bio-Rad (transferencia sumergida). Se utilizó un protocolo estándar de transferencia de proteínas (Hames, 1990), empleando como solución de transferencia Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8,3, con el agregado de metanol 20% (V/V). La transferencia se realizó a intensidad de corriente constante de 180 mA durante 1 h, refrigerando el dispositivo en todo momento. El éxito de la misma se evaluó detectando la presencia de proteínas con solución de Rojo Ponceau (Sigma) 0,25% (P/V) en ácido acético al 15% (V/V) y metanol al 40% (V/V). El colorante se eluyó por lavados sucesivos con solución de TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5).

Posteriormente, se realizó la detección inmunoquímica del rhIFN- α 2b como se detalla a continuación:

- 1- Bloqueo: Los sitios de la membrana de PVDF sin proteínas adsorbidas fueron bloqueados por inmersión de la misma en solución de leche descremada 5% (P/V) en TBS durante 1 h a temperatura ambiente con agitación.
- 2- Primera incubación: La membrana de PVDF se incubó con una solución de Igs de conejo anti-rhIFN- α 2b (suero de conejo C7) en una dilución 1:4.000 preparada en leche descremada 0,5% (P/V) en TBS (solución diluyente de *Western blot*). Se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con agitación.
- 3- Segunda incubación: La membrana se incubó con anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo conjugados con la enzima peroxidasa en una dilución 1:2.000 en solución diluyente de *Western blot*. Se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con agitación.
- 4- Revelado: Se empleó el *kit* de quimioluminiscencia ECLTM *Western Blotting Analysis System* (GE Healthcare, EE.UU.), siguiendo las indicaciones del fabricante. La membrana se incubó con el reactivo durante 5 min a temperatura ambiente, se escurrió y se colocó en un soporte de *nylon* sellando los extremos para evitar el contacto del sustrato con la película reveladora. Finalmente, la membrana fue expuesta a una película fotográfica Kodak Biomax XAR *Film* (Kodak, EE.UU.) en cuarto oscuro durante diferentes tiempos, de manera de lograr la máxima resolución con un buen contraste entre la señal quimioluminiscente y el fondo. El revelado de la película fotográfica se efectuó en forma manual empleando el método convencional de revelado (Revelador y Reforzador GBX, Kodak, Brasil) y fijación (Fijador gráfico LITH, AGFA, Argentina).

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

12.2. ISOELECTROENFOQUE

El análisis de las isoformas de las variantes de rhIFN- α 2b se realizó mediante focalización isoelectrónica, utilizando un sistema de GE Healthcare compuesto por una cuba de electroforesis (Multiphor II), un baño refrigerante (Multitemp III) y una fuente de voltaje (EPS3500XL).

La técnica de isoelectroenfoco se llevó a cabo en geles de 1 mm de espesor, de una concentración de acrilamida/bisacrilamida del 8% (P/V), con el agregado de urea 7 M. El rango de pH se obtuvo mediante la mezcla de un 20% (V/V) de anfolitos de pH 4,0-6,5 y un 80% (V/V) de anfolitos de pH 2,5-5,0. Una vez preparado el soporte electroforético, se realizó el preenfocado de los anfolitos durante 1 h a 10 W, 2.000 V y 100 mA con el fin de generar el gradiente de pH. Posteriormente, se sembraron entre 5 y 20 μ l de las muestras a una distancia de 1 cm desde el cátodo. El enfocado se realizó durante 40 min, empleando las mismas condiciones que para la etapa de preenfocado.

Los componentes así separados fueron transferidos a membranas de PVDF, utilizando la unidad de transferencia electroforética horizontal Multiphor II Nova Blot (GE Healthcare). La transferencia se llevó a cabo durante 1 h a 2.000 V, 10 W y una intensidad de corriente igual al área de la membrana multiplicada por un factor de 0,8 (intensidad máxima 100 mA), empleando la misma solución de transferencia descrita para los ensayos de *Western blot*.

La detección inmunológica de las isoformas de los análogos de rhIFN- α 2b transferidas a las membranas se realizó siguiendo el protocolo descrito para los ensayos de *Western blot*.

13. CONSTRUCCIÓN DE VECTORES PARA EXPRESIÓN EN CÉLULAS EUCARIOTAS CONTENIENDO EL GEN DEL rhIFN- α 2b Y SUS VARIANTES MUTADAS

13.1 TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR PARA CLONADO

13.1.1. PREPARACIÓN DE ADN PLASMÍDICO

Todos los métodos de purificación de ADN plasmídico se basan en el tamaño relativamente pequeño y la naturaleza circular de los plásmidos, en comparación con las moléculas lineales y de gran tamaño molecular del ADN cromosómico celular.

Con el fin de obtener cantidades suficientes del vector de expresión para realizar el clonado molecular del rhIFN- α 2b y sus muteínas, se realizó una preparación de ADN plasmídico en gran escala (maxiprep), empleando el método de lisis alcalina descrito en Sambrook y col. (1989b). Para ello, 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. Posteriormente, se tomó una colonia aislada y se la cultivó en 3 ml de medio LB líquido suplementado con ampicilina durante 4 h a 37°C con agitación a 200 rpm. Luego, el cultivo se amplificó a un erlenmeyer conteniendo 300 ml de medio LB y se incubó durante toda la noche en las mismas condiciones. Las células se centrifugaron a 5.000 rpm durante 15 min a 4°C en una centrifuga Beckman AvantiTM J-30I, rotor JA10 (EE.UU.). Se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 6 ml de solución I [Tris 25 mM pH 8, Na₂EDTA 10 mM, glucosa 1% (V/V)], incubándose durante 5 min en hielo. Se adicionaron 12 ml de solución II [NaOH 0,2 N, SDS 1% (V/V)] y se incubó 5 min en hielo. Se agregaron 9 ml de solución III [K⁺ 3 M, Ac⁻ 5 M], se incubó durante 10 min en hielo y se centrifugó a 10.000 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. Se centrifugó a 5.000 rpm durante 20 min a 4°C y el precipitado se resuspendió en 0,6 ml de una solución de etanol 80% (V/V), Tris 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 en una centrífuga Eppendorf MiniSpin® plus (Alemania). El *pellet* se resuspendió en 0,5 ml de solución TE (Tris 25 mM pH 8, Na₂EDTA 10 mM), realizándole dos extracciones con fenol/cloroformo 1:1 (V/V) y una posterior extracción con cloroformo, centrifugando en ambos casos a 14.000 rpm durante 2 min y conservando siempre la fase acuosa. El sobrenadante se precipitó nuevamente con 0,6 volúmenes de isopropanol y se centrifugó a 14.000 rpm durante 5 min. El precipitado se lavó con etanol 80% (V/V) y se resuspendió en 0,5 ml de solución TE con el agregado de ARNasa (Promega) 100 µg.ml⁻¹. Se repitieron las tres extracciones empleando los solventes orgánicos mencionados y el ADN presente en la fase acuosa se precipitó mediante el agregado de 50 µl de NaAc 3 M pH 7 y 0,5 ml de isopropanol, centrifugando a 14.000 rpm durante 5 min. El *pellet* se lavó con 0,5 ml de etanol 80% (V/V) y se resuspendió en 0,5 ml de solución TE.

Con el objeto de obtener una pureza y concentración adecuadas de los diferentes vectores construidos para realizar su secuenciación y emplearlos en experimentos de transfección de células eucariotas, se realizó una extracción plasmídica en escala intermedia, utilizando el *kit Wizard SV 96 Plasmid DNA Purification System* (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante.

En ambos casos, la integridad de los plásmidos se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa (sección 13.1.3) y la concentración y pureza de los mismos se determinó por medida de su absorbancia a λ=260 nm y λ=280 nm en espectrofotómetro UV-visible (Ultrospec 2000), según las ecuaciones 6 y 7 (Sambrook y col., 1989c).

$$\text{Concentración de ADN } (\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}) = \text{DO}(260 \text{ nm}) \times 50 \frac{\mu\text{g ADN}\cdot\text{ml}^{-1}}{\text{DO}} \times (\text{dilución})^{-1} \quad (6)$$

$$\text{Pureza de la muestra} = \frac{\text{DO}(260 \text{ nm})}{\text{DO}(280 \text{ nm})} \quad (7)$$

El valor de pureza debe estar comprendido en el rango entre 1,8 y 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.

Para analizar la presencia del gen de interés en las colonias transformadas, se realizó una extracción plasmídica en pequeña escala. Con este fin, se tomaron colonias individuales y se cultivaron en 5 ml de medio LB suplementado con ampicilina durante toda la noche a 37°C con agitación a 200 rpm. Se centrifugaron 1,5 ml de cultivo a 10.000 rpm durante 5 min. El *pellet* obtenido se resuspendió en 100 µl de solución I, incubándose durante 5 min en hielo. Se adicionaron 200 µl de solución II y se incubó nuevamente 5 min en hielo. Se agregaron 150 µl de solución III, se incubó durante 10 min en hielo y se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 min. Se tomó el sobrenadante y se realizó una extracción con fenol/cloroformo 1:1 (V/V) y una extracción con cloroformo, centrifugando en ambos casos a 14.000 rpm durante 2 min. Finalmente, se precipitó el ADN con 0,6 volúmenes de isopropanol, incubando 10 min a temperatura ambiente y centrifugando a 14.000 rpm durante 10 min. El precipitado se lavó dos veces con etanol 70% (V/V) y se resuspendió en 20 µl de agua autoclavada.

13.1.2. 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 (sección 13.1.3) para su posterior análisis y/o purificación.

13.1.3. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Las separaciones de ADN en geles de agarosa se realizaron empleando el sistema submarino (Sambrook y col., 1989d). Para la preparación de los geles, de concentración de agarosa variable entre 0,8% y 1,5% (P/V), se pesó la cantidad adecuada de agarosa (Biodynamics SRL, Argentina) y se disolvió en *buffer* TAE (Tris-Acetato 40 mM pH 8, Na_2EDTA 1 mM) en horno microondas hasta completa fundición. La solución se enfrió a 60°C y se adicionó bromuro de etidio en una concentración final de 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Esta solución se colocó en un soporte adecuado y se le introdujo un peine de 1 mm de espesor para formar los carriles de siembra, el cual se retiró una vez solidificado. El gel se colocó en una cuba electroforética y se cubrió completamente con *buffer* TAE.

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

Finalmente, el gel fue examinado utilizando un transiluminador UV (UVP, EE.UU.) y fotografiado. El fundamento de la detección de los fragmentos de ADN empleando luz UV se basa en que el bromuro de etidio presenta una estructura planar que le permite intercalarse entre las bases de las moléculas de ácidos nucleicos y originar un incremento en la fluorescencia comparado con el colorante libre. La radiación UV es absorbida y la energía es emitida en la región del espectro visible correspondiente a 590 nm (roja-naranja).

Para estimar la longitud de los fragmentos de ADN separados se empleó el marcador de masa molecular CIEN marker (Biodynamics).

13.1.4. PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN

Los fragmentos de ADN de hasta 1.000 pb fueron purificados a partir de geles de agarosa utilizando el *kit GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La purificación de fragmentos de un tamaño superior a 1.000 pb, como es el caso de los plásmidos digeridos con enzimas de restricción, se realizó a partir de la mezcla de reacción, realizando dos extracciones sucesivas con un volumen de la mezcla fenol/cloroformo 1:1 (V/V) y una posterior extracción con cloroformo. El ADN presente en la fase acuosa se precipitó mediante el agregado de 0,5 volúmenes de NaAc 3 M pH 7 y 2 volúmenes de etanol. El precipitado se lavó 2 veces con etanol 70% (V/V) y se resuspendió en un volumen adecuado de agua autoclavada.

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

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

13.1.5. REACCIONES DE LIGACIÓN DE ADN

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

13.1.6. PREPARACIÓN DE CÉLULAS DE *ESCHERICHIA COLI*/DH5 α F'1q COMPETENTES

La mayoría de los métodos de transformación de bacterias se basan en las observaciones de Mandel e Higa (1970), quienes demostraron que las bacterias tratadas con soluciones frías de CaCl₂ y luego sometidas a un breve *shock* con calor incorporaban el ADN del bacteriófago λ . El mismo método fue subsecuentemente utilizado para transformar bacterias con ADN plasmídico (Cohen y col., 1972). Aparentemente, este tratamiento induce un estado transitorio de competencia de las bacterias receptoras, durante el cual son capaces de incorporar ADN de diferentes orígenes. Se han desarrollado muchas variantes de la técnica básica dirigidas a optimizar la eficiencia de transformación de diferentes cepas.

Para la preparación de bacterias competentes se realizó una estría de *E. coli* DH5 α F'1q, obtenida de un *stock* conservado a -70°C, sobre una placa de agar LB. Se cultivó durante toda la noche a 37°C. Se escogió al azar una de las colonias desarrolladas y se inoculó en 3 ml de medio LB, incubándose a 37°C durante toda la noche con agitación a 200 rpm. El cultivo se repicó en una dilución 1:100 en 50 ml de medio LB y se incubó a 37°C con agitación durante aproximadamente 3 h, hasta alcanzar una DO a λ =550 nm de aproximadamente 0,5. Posteriormente, las células fueron trasvasadas aseptícamente a un tubo de centrifuga estéril enfriado previamente e incubadas durante 15 min en baño de hielo. Las bacterias se cosecharon mediante centrifugación a 4.000 rpm durante 10 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el *pellet* celular se resuspendió en 20 ml de solución de transformación I fría [KAc 30 mM, KCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, MnCl₂ 50 mM y glicerol 15% (V/V), pH 5,8, esterilizada por filtración a través de una malla de 0,22 μ m]. Se incubó durante 10 min en baño de hielo y luego se centrifugó a 4.000 rpm durante 10 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y las bacterias se resuspendieron en 2 ml de solución de transformación II [MOPS 10 mM, KCl 10 mM, CaCl₂ 75 mM y glicerol 15% (V/V), pH 6,5, esterilizada mediante filtros de 0,22 μ m], incubándose nuevamente durante 15 min en hielo. Finalmente, la suspensión celular fue dispensada en alícuotas de 100 μ l en criotubos fríos y conservada a -70°C hasta su utilización.

13.1.7. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

Para realizar la transformación bacteriana se descongelaron 100 μl de células competentes y se mezclaron con 10 μl de la mezcla de ligación, incubando durante 30 min en baño de hielo. Posteriormente, el tubo se colocó en un baño a 42°C durante 1 min e inmediatamente se transfirió nuevamente a hielo, incubándose durante 5 min. Se adicionaron 900 μl de medio LB y se incubó durante 60 min a 37°C con agitación a 200 rpm, con el objeto de permitir la recuperación de las bacterias de la situación de estrés a la cual fueron sometidas. Las células se cosecharon mediante centrifugación a 5.000 rpm durante 5 min, se descartaron 850 μl de sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en el volumen remanente de medio. Finalmente, la totalidad de la suspensión celular se distribuyó en forma homogénea sobre una placa conteniendo agar LB suplementado con ampicilina, de manera de seleccionar las bacterias transformadas, y se incubó durante toda la noche a 37°C. En el caso de utilizar un vector que permite la α -complementación, la placa se suplementó con X-gal e IPTG.

13.2. AISLAMIENTO DE LA REGIÓN CODIFICANTE DEL hIFN- α 2b

Con el objeto de obtener la secuencia codificante del hIFN- α 2b, se realizó una extracción de ADN genómico a partir de células de sangre periférica humana (Sambrook y col., 1989e). Para ello, se recolectaron 20 ml de sangre fresca en tubos conteniendo 3,5 ml de anticoagulante compuesto por ácido cítrico 0,48% (V/V), citrato de sodio 1,32% (P/V) y glucosa 1,47% (P/V). Este anticoagulante tiene la capacidad de preservar mejor el ADN de alto peso molecular durante el almacenamiento de la sangre que el Na₂EDTA (Gustafson y col., 1987). La sangre se centrifugó a 1.300 g durante 15 min y se descartó el plasma sobrenadante. La capa de la interfase, correspondiente a células sanguíneas blancas de densidad heterogénea, se transfirió a un nuevo tubo y se centrifugó en las mismas condiciones. Las células se resuspendieron en 3 ml de solución de extracción [Tris 10 mM, EDTA 0,1 M, pH 8, ARNasa pancreática (Sigma) 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, SDS 0,5% (V/V)], incubándose durante 2 h a 37°C. Se adicionó proteinasa K (Sigma) de manera de obtener una concentración final de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y se incubó durante 1 h en un baño de agua a 50°C, agitando periódicamente con el objeto de fragmentar la cromatina. La solución se enfrió a temperatura ambiente y se realizaron tres extracciones sucesivas: una extracción con fenol, una extracción con la mezcla fenol/cloroformo 1:1 (V/V) y una extracción con cloroformo. El ADN presente en la fase acuosa se precipitó mediante el agregado de 0,4 volúmenes de AcNH₄ 5 M y dos volúmenes de etanol, incubándose durante toda la noche a 4°C. El ADN precipitado se recolectó mediante centrifugación a 5.000 rpm durante 10 min a 4°C y el *pellet* se lavó dos veces con etanol 70% (V/V). El precipitado se dejó secar y se resuspendió en 1 ml de agua estéril. La concentración de ADN se determinó mediante medición espectrofotométrica a $\lambda=260$ nm.

El ADN genómico purificado se utilizó como molde para realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el objeto de amplificar el gen del hIFN- α 2b. Para ello, se emplearon los siguientes oligonucleótidos en sentido directo (*forward*, F) y reverso (*reverse*, R), respectivamente, los cuales hibridan en ambos extremos de la región codificante del hIFN- α 2b y adicionan sitios de restricción que permiten el posterior clonado en diferentes vectores:

IFN2AF 5' GAATTCACATCTACAATGGCCTTGAC 3'
EcoRI

IFN2AR 5' TCTAGAGTCTTTGAAATGGCAGATCA 3'
XbaI

Para la reacción de PCR se utilizó la enzima ADN polimerasa Platinum[®] Pfx (Invitrogen), la cual proviene de la cepa KOD de *Thermophilus* sp. Esta enzima posee actividad exonucleasa 3'-5', por lo que provee una alta fidelidad de replicación, y una elevada procesividad y velocidad de extensión de cadenas. La mezcla de reacción se preparó de la siguiente manera:

Pfx Amplification buffer 10 X	5,0 µl
MgSO ₄ 50 mM	1,0 µl
dNTPs 10 mM	5,0 µl
Oligonucleótido IFN2AF 50 µM	1,0 µl
Oligonucleótido IFN2AR 50 µM	1,0 µl
Molde (ADN genómico) 125 µg.ml ⁻¹	1,0 µl
Platinum [®] Pfx	0,5 µl
Agua autoclavada	35,5 µl

Además, se realizó un control negativo sin el agregado de templado. La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Biometra, Alemania), de acuerdo con el siguiente programa:

3 min a 94°C	
1 min a 94°C	} 30 ciclos
1 min a 55°C	
1 min a 72°C	
5 min a 72°C	

Los amplicones fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa en comparación con un patrón de masa molecular (CIEN marker), purificándose el producto del tamaño esperado.

13.3. CLONADO DEL GEN DEL hIFN-α2b EN EL PLÁSMIDO pGEM[®]-T EASY

El plásmido pGEM[®]-T Easy (Promega) posee un origen de replicación bacteriana que permite su amplificación en *E. coli* (f1 ori) y un gen que codifica para resistencia a ampicilina en estas células (Amp^R). Además, posee un sitio de múltiple clonado en el interior del gen *lacZ*, el cual codifica para el fragmento α de la enzima β-galactosidasa, permitiendo la α-complementación. De esta manera, en presencia de IPTG (inductor del promotor lac) y X-gal (sustrato cromogénico de la enzima), se pueden seleccionar colonias blancas o azules, según posean o no la secuencia de interés. Este vector es provisto linealizado con una molécula de timidina en los extremos 3', lo cual impide la religación del vector y aumenta considerablemente la eficiencia de ligación de productos de PCR generados por determinadas polimerasas. Estas polimerasas agregan un nucleótido desoxiadenuina trifosfato (dATP) al finalizar el copiado de una hebra de ADN, independientemente de la naturaleza del templado.

Debido a que la ADN polimerasa Platinum[®] Pfx no posee dicha característica, fue necesario adicionar el nucleótido dATP en el extremo 3' del producto de PCR conteniendo el gen

del hIFN- α 2b. Para ello, se utilizó la enzima ADN polimerasa *Taq* (Invitrogen), preparándose la siguiente mezcla de reacción:

<i>PCR buffer</i> 10 X	1,0 μ l
MgCl ₂ 50 mM	0,3 μ l
dATP 4 mM	0,5 μ l
Molde (producto de PCR)	7,0 μ l
<i>Taq</i> ADN polimerasa	1,0 μ l
Agua autoclavada	0,2 μ l

La reacción se llevó a cabo en un termociclador, incubándose durante 40 min a 72°C.

Posteriormente, el producto de esta reacción se ligó con el plásmido pGEM[®]-T Easy y se realizó la transformación bacteriana. El análisis de las colonias transformadas se realizó por digestión del ADN plasmídico obtenido de colonias blancas elegidas al azar con las enzimas *EcoR* I y *Xba* I. Para confirmar la identidad de la secuencia clonada, se realizó la secuenciación automática (Macrogen, Corea) del ADN plasmídico de clones bacterianos positivos, utilizando los oligonucleótidos *forward* y *reverse* del fago M13 (M13Fw y M13Rv, respectivamente). En la Fig. 9 se muestra un esquema de la construcción pGEM[®]-T Easy IFN- α 2b.

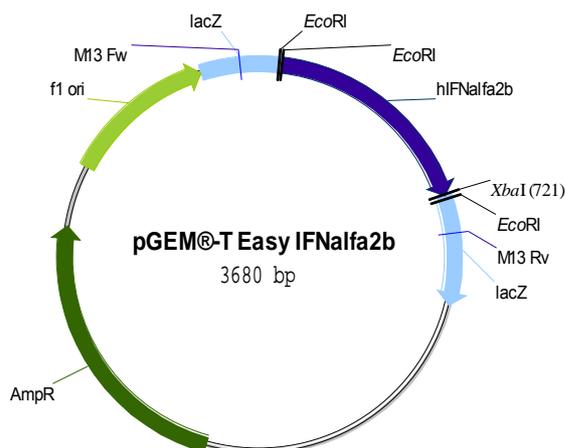


Fig. 9. Representación gráfica del plásmido pGEM[®]-T Easy IFN- α 2b.

13.4. SUBCLONADO DEL GEN DEL hIFN- α 2b EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN pCI-NEO

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

Con el fin de clonar el gen del hIFN- α 2b en este plásmido, se realizó una digestión de la construcción pGEM[®]-T Easy IFN- α 2b con las enzimas *EcoR* I y *Xba* I para liberar el fragmento de

interés, el cual se purificó a partir de geles de agarosa. Por otro lado, el plásmido pCI-neo se digirió con las mismas enzimas y, con el fin de disminuir la eficiencia de religación de la fracción de plásmido digerido con una única enzima, se realizó la desfosforilación enzimática del mismo. Para ello, se adicionaron 0,01 U de fosfatasa alcalina de intestino de ternero (CIAP, Gibco) por cada picomol de extremos de ADN y se incubó durante 30 min a 37°C. Posteriormente, se agregó otra alícuota de enzima y se incubó nuevamente durante 30 min a 37°C. La reacción se detuvo mediante el agregado de CIAP *stop buffer* [Tris 10 mM pH 7,5, Na₂EDTA 1 mM pH 7,5, NaCl 200 mM y SDS 0,5% (V/V)]. Finalmente, el ADN plasmídico fue purificado a partir de la mezcla de reacción (sección 13.1.4) y ligado al inserto de interés. Luego de realizar la transformación bacteriana, se seleccionaron clones al azar y se analizó la presencia del inserto mediante digestión de su ADN plasmídico con las enzimas *EcoR* I y *Xba* I. Finalmente, se realizó la secuenciación automática del ADN plasmídico de clones positivos utilizando los oligonucleótidos T3 y T7, los cuales hibridan con los promotores de la ARN polimerasa de los fagos T3 y T7, respectivamente. En la Fig. 10 se muestra un esquema de la construcción pCI-neo hIFN- α 2b.

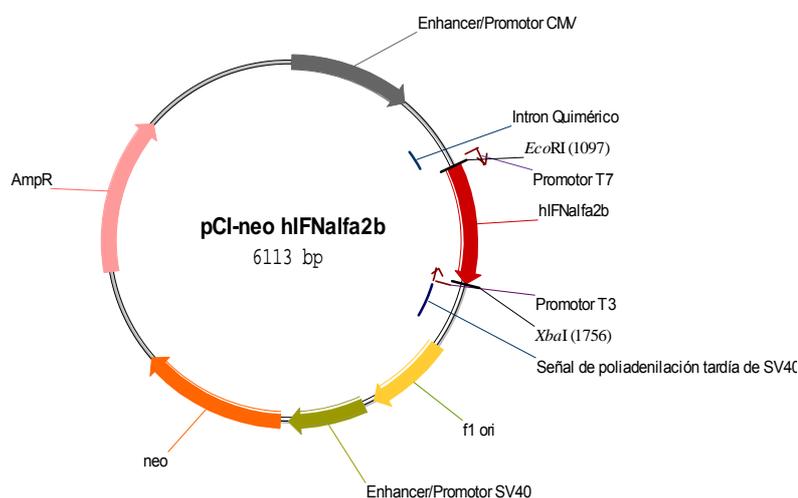


Fig. 10. Representación gráfica del plásmido pCI-neo IFN- α 2b

13.5. MUTAGÉNESIS SITIO DIRIGIDA DEL rhIFN- α 2b

El procedimiento de mutagénesis sitio dirigida para la introducción de sitios susceptibles de *N*-glicosilación en el gen del rhIFN- α 2b se llevó a cabo utilizando la técnica de extensión por solapamiento mediante PCR (ES-PCR), la cual consistió básicamente en dos etapas de PCR consecutivas (Ho y col., 1989) (Fig. 11).

En la primera etapa se realizaron dos reacciones de PCR independientes para generar dos fragmentos de ADN cuyos extremos se solapan. En el tubo A se utilizó un oligonucleótido externo, que hibrida en un extremo del gen del rhIFN- α 2b clonado en el vector pCI-neo, en sentido *reverse* (IFN α R), y un oligonucleótido interno, que contiene la mutación puntual, en sentido *forward* (mutXa, en donde X representa la posición del aminoácido mutado en la cadena polipeptídica). En el tubo B se realizó una mezcla de reacción utilizando un oligonucleótido externo, que hibrida en el otro extremo del gen del rhIFN- α 2b clonado en el vector pCI-neo, en sentido *forward* (IFN α F), y un oligonucleótido interno, que contiene la mutación puntual, en

sentido *reverse* (mutXb). En ambos casos se utilizó la enzima ADN polimerasa Platinum® *Pfx*, utilizando como molde el plásmido pCI-neo hIFN- α 2b.

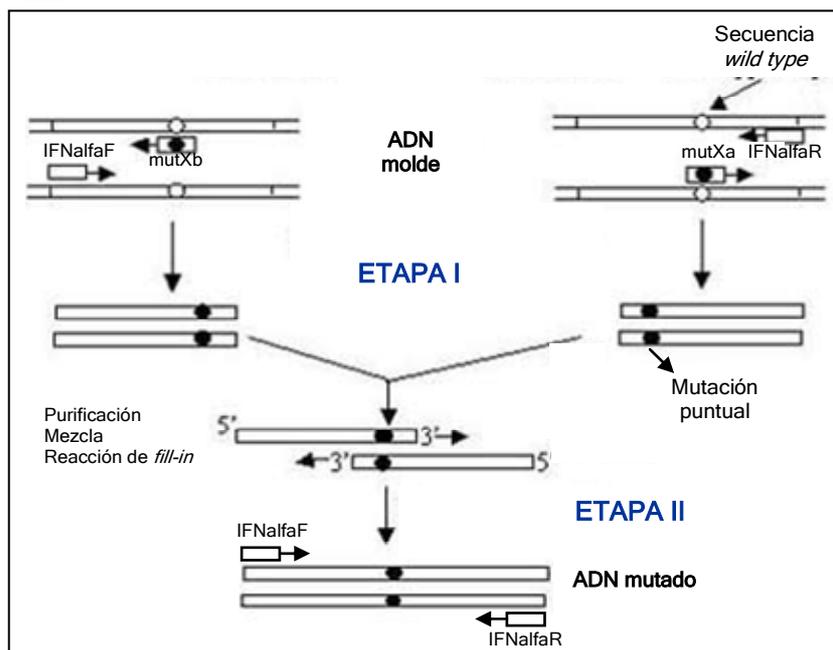


Fig. 11. Mutagénesis sitio-dirigida mediante ES-PCR.

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

La mezcla de reacción se preparó de la siguiente manera:

Reactivo	Tubo A	Tubo B
<i>Pfx</i> Amplification buffer 10 X	5,0 μ l	5,0 μ l
MgSO ₄ 50 mM	1,0 μ l	1,0 μ l
dNTPs 10 mM	5,0 μ l	5,0 μ l
Oligonucleótido IFNalfaF 50 μ M	-	1,0 μ l
Oligonucleótido IFNalfaR 50 μ M	1,0 μ l	-
Oligonucleótido mutXa 50 μ M	1,0 μ l	-
Oligonucleótido mutXb 50 μ M	-	1,0 μ l
Molde (pCI-neo hIFN- α 2b) 425 μ g.ml ⁻¹	1,0 μ l	1,0 μ l
Platinum® <i>Pfx</i>	0,5 μ l	0,5 μ l
Agua autoclavada	35,5 μ l	35,5 μ l

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

3 min a 94°C	
1 min a 94°C	} 30 ciclos
1 min a 55°C	
1 min a 72°C	
5 min a 72°C	

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

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

<i>Pfx Amplification buffer</i> 10 X	5,0 μ l
MgSO ₄ 50 mM	1,0 μ l
dNTPs 10 mM	5,0 μ l
Fragmento mutXa purificado	5,0 μ l
Fragmento mutXb purificado	5,0 μ l
Platinum [®] <i>Pfx</i>	0,5 μ l
Agua autoclavada	28,5 μ l

La reacción se llevó a cabo en un termociclador, utilizando el mismo programa que para las reacciones de PCR de la primera etapa. Cuando finalizaron los tres primeros ciclos, se agregó a la mezcla de reacción 1 μ l de cada uno de los oligonucleótidos externos IFN α F e IFN α R y se continuó con el mismo programa.

El producto de PCR obtenido se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa, purificándose la banda correspondiente al gen del rhIFN- α 2b mutado.

En la Tabla IV se muestran las secuencias de todos los oligonucleótidos empleados, así como el tamaño esperado de cada uno de los fragmentos producidos en la primera etapa de PCR. Los oligonucleótidos externos IFN α F e IFN α R contienen los sitios de restricción para las enzimas *Eco*R I y *Xba* I, respectivamente, para realizar el clonado posterior de las muteínas en el vector pCI-neo.

13.6. CLONADO DE LOS GENES DE LAS MUTEÍNAS DEL rhIFN- α 2b EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN pCI-NEO

Para realizar el clonado de los genes de las muteínas del rhIFN- α 2b para su expresión en células eucariotas, los productos obtenidos en la segunda etapa de PCR se digirieron con las enzimas *Eco*R I y *Xba* I y se purificaron a partir de la solución con el fin de eliminar los fragmentos cortos de ADN liberados, las sales y las enzimas de restricción. Posteriormente, se ligaron al vector pCI-neo digerido con las mismas enzimas y desfosforilado como se indica en la sección 13.4. Luego de la transformación bacteriana, se seleccionaron clones al azar y se analizó la presencia del inserto mediante digestión con las mismas enzimas de restricción. Finalmente, se realizó la secuenciación automática del ADN plasmídico de clones positivos para verificar la presencia de las mutaciones introducidas.

Tabla IV. Oligonucleótidos empleados para la mutagénesis sitio-dirigida del hIFN- α 2b.

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño del fragmento (Etapa 1 - ES-PCR)
IFNalfaF	5' TAACGAATTCACATCTACAATGGCCTTGAC 3' <i>EcoR</i> I	-
IFNalfaR	5' ATAGTCTAGAGTCTTTGAAATGGCAGATCA 3' <i>Xba</i> I	-
mut4a	5' GGGCTGTGATCTG AAT CAAACCCACAGCCT 3'	589 pb
mut4b	5' AGGCTGTGGGTTTGATTCAGATCACAGCCC 3'	114 pb
mut6a	5' GCTGTGATCTGCCTCAA AAC CACAGCCTGGG 3'	587 pb
mut6b	5' CCCAGGCTGTGGTTTTGAGGCAGATCACAGC 3'	117 pb
mut9a	5' CCTCAAACCCACAGC AAC GGTAGCAGGAGG 3'	576 pb
mut9b	5' CCTCCTGCTACCGTTGCTGTGGGTTTGAGG 3'	127 pb
mut12a	5' GCCTGGGTAGCA AAC AGGACCTTGATGCTCC 3'	563 pb
mut12b	5' GGAGCATCAAGGTCCTGTTGCTACCCAGGC 3'	140 pb
mut23a	5' GGCACAGATGAGGA AAT ATCTCTCTTTTCTC 3'	532 pb
mut23b	5' GAGAAAAGAGAGAT ATT CTCATCTGTGCC 3'	171 pb
mut47a	5' GGAGTTTGGCAACCAG ACCC AAAAGGCTG 3'	463 pb
mut47b	5' CAGCCTTTTGG GT CTGGTTGCCAAACTCC 5'	239 pb
mut67Na	5' GCAGATCTTCAATCTC AAC AGCACAAAGG 3'	403 pb
mut67Nb	5' CCTTTGTGCTGTTGAGATTGAAGATCTGC 3'	299 pb
mut67Ta	5' GCAGATCTTCAATCTC ACC AGCACAAAGG 3'	403 pb
mut67Tb	5' CCTTTGTGCTG GT GAGATTGAAGATCTGC 3'	299 pb
mut70a	5' CTCTTCAGCACAA AAT GACTCATCTGCTGCTTGG 3'	390 pb
mut70b	5' CCAAGCAGCAGATGAGTCATTTGTGCTGAAGAG 3'	316 pb
mut77a	5' CATCTGCTGCTTGG AAT GAGACCCTCCTAGACA 3'	371 pb
mut77b	5' TGTCTAGGAGGGTCTCATTCCAAGCAGCAGATG 3'	335 pb
mut95a	5' CCAGCAGCTGAATGAC ACG GAAGCCTGTGTG 3'	319 pb
mut95b	5' CACACAGGCTTCC GT GTCAATCAGCTGCTGG 3'	385 pb
mut113a	5' GACTCCCCTGATGAAG AAC GACTCCATTCTG 3'	265 pb
mut113b	5' CAGAATGGAGTC GTT CTTCATCAGGGGAGTC 3'	439 pb
mut125a	5' GAGGAAATACTTCCAAA AC ATCACTCTCTATC 3'	229 pb
mut125b	5' GATAGAGAGTGAT GTTT TGGAAGTATTCCTC 3'	476 pb
mut158Ta	5' GTCAACAACTTG AAT GAAAGTTTAAGAAG 3'	127 pb
mut158Tb	5' CTTCTTAACTTT CA TTCAAGTTTGTTGAC 3'	576 pb

Los nucleótidos mutados se señalan en negrita. Los codones que se traducen en el aminoácido mutado se encuentran subrayados. Cuando el aminoácido puede sustituirse tanto por Asn como por Thr para obtener la secuencia consenso Asn-Xxx-Thr, se indica en el nombre del oligonucleótido con la letra N (Asn) o T (Thr).

13.7. CONSTRUCCIÓN DE MUTEÍNAS DEL rhIFN- α 2b CON UN NÚMERO VARIABLE DE SITIOS SUSCEPTIBLES DE *N*-GLICOSILACIÓN

La construcción de muteínas del rhIFN- α 2b con más de un sitio de *N*-glicosilación se realizó empleando la técnica de mutagénesis sitio-dirigida descrita en la sección 13.5. De esta manera, se construyó una mutante con dos sitios de *N*-glicosilación utilizando como molde el plásmido pCI-neo conteniendo una variante del rhIFN- α 2b a la que previamente se le incorporó un sitio consenso de *N*-glicosilación. Posteriormente, esta muteína se empleó como molde para la construcción de una variante con tres sitios de *N*-glicosilación y así sucesivamente se realizó la incorporación secuencial de nuevas mutaciones. En cada etapa, cada variante fue clonada en el plásmido pCI-neo y secuenciada para verificar el éxito de las mutaciones realizadas.

14. TRANSFECCIONES DE CÉLULAS EUCARIOTAS

La introducción de ADN exógeno en células eucariotas se realizó empleando la técnica de transfección mediada por lípidos catiónicos o lipofección (Felgner y col., 1987). En soluciones acuosas, los lípidos catiónicos forman pequeñas vesículas unilaminares (liposomas), con un tamaño promedio entre 600 y 1.200 nm. El método se basa en la interacción iónica de estos liposomas, cuya superficie se encuentra cargada positivamente, tanto con los grupos fosfato del ADN como con las cargas negativas de la superficie celular. El ADN en solución no es encapsulado dentro del liposoma sino que se une espontáneamente a las cargas positivas de los mismos formando complejos que son captados por las células en cultivo. El método original fue mejorado mediante el reemplazo del lípido monocatiónico por reactivos policatiónicos, como el LipofectamineTM (Hawley-Nelson y col., 1993).

Las condiciones óptimas de transfección para la línea celular CHO.K1 fueron puestas a punto previamente en el laboratorio, analizando las eficiencias de transfección de diferentes lípidos catiónicos comerciales en distintas proporciones lípido:ADN. En este caso, se utilizó el lípido LipofectamineTM 2000 (Invitrogen), para el cual se estableció una relación óptima lípido:ADN de 2:1 (Zuqueli, 2006).

El protocolo general para la transfección de células CHO.K1 se describe a continuación:

- 1- Las células CHO.K1 *wild type* fueron cultivadas en medio A suplementado con SFB 5% (V/V). Cuando el cultivo se encontraba en fase de crecimiento exponencial, las células se cosecharon mediante desprendimiento enzimático con tripsina, se contaron y se resuspendieron en el mismo medio de manera de obtener una densidad celular de $1,5 \cdot 10^5$ cél.ml⁻¹. Se sembraron 3 ml de esta suspensión en las cavidades de una placa de cultivo estéril de 6 pozos. Se incubó durante 24 h a 37°C, hasta alcanzar aproximadamente un 80% de confluencia.
- 2- Se retiró el sobrenadante de los pozos y, con el fin de eliminar los restos de SFB, las células se lavaron con 3 ml de medio A.
- 3- Para cada pozo, se preparó una solución 33,3 μ g.ml⁻¹ del lípido, mezclando 10 μ l de LipofectamineTM 2000 (1 mg.ml⁻¹) con 290 μ l de medio A. Por otro lado, se preparó una solución del plásmido 16,6 μ g.ml⁻¹, mezclando el volumen correspondiente de ADN con medio A hasta un volumen final de 300 μ l.
- 4- Se mezclaron ambas soluciones y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente para permitir la formación de los complejos. Como control de la toxicidad del lípido sobre las células, se mezclaron 300 μ l de la solución de lípido con 300 μ l de medio A.

Posteriormente, se adicionaron 400 μ l de medio A para llevar la solución a un volumen final de 1 ml.

- 5- Se eliminó la solución de lavado de las células a transfectar y se agregaron los complejos preparados, incubándose durante 4 h a 37°C.
- 6- Se retiró el sobrenadante de las placas de cultivo y se agregaron 3 ml de medio A suplementado con SFB 5% (V/V), incubándose durante 72 h a 37°C.

14.1. TRANSFECCIONES TRANSITORIAS DE CÉLULAS CHO.K1 PARA EL ANÁLISIS DEL rhIFN- α 2b Y SUS VARIANTES MUTADAS

Para evaluar la integridad de las construcciones plasmídicas y la expresión de las muteínas glicosiladas de rhIFN- α 2b, se realizaron transfecciones transitorias de células CHO.K1 con todos los vectores obtenidos, incluyendo el plásmido pCI-neo rhIFN- α 2b *wild type*, siguiendo el protocolo descrito en la sección 14. Luego de 72 h post-transfección, se cosechó el sobrenadante de los pozos y se conservó a -20°C para su análisis. Para todos los sobrenadantes, se determinó la concentración de rhIFN- α 2b (mediante técnica de ELISA *sandwich*, sección 10.1.1) y se realizó la valoración biológica antiviral y antiproliferativa (secciones 11.1 y 11.2), calculándose la actividad biológica específica (ABE) de cada muteína de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$ABE \text{ (UI.ng}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Actividad biológica (UI.ml}^{-1}\text{)}}{\text{Concentración (ng.ml}^{-1}\text{)}} \quad (8)$$

Por otro lado, con el fin de estudiar la presencia de glicosilación en las nuevas variantes de rhIFN- α 2b, se analizó el perfil electroforético de las muteínas mediante ensayos de *Western blot* (sección 12.1). Además, para confirmar la presencia de oligosacáridos unidos a las diferentes proteínas, los sobrenadantes se sometieron a una reacción de *N*-deglicosilación enzimática, utilizando el *kit* PNGasa F (Biolabs Inc., Inglaterra). Con este fin, se incubaron 40 μ l de sobrenadante con 4,4 μ l de *buffer* de desnaturalización 10 X [(SDS 5% (P/V), β -mercaptoetanol 10% (V/V)] durante 10 min a 100°C. Posteriormente, se adicionó 1/10 de volumen de *buffer* G7 (fosfato de sodio 0,5 M, pH 7,5) y 1/10 de volumen del detergente NP-40 10% (V/V). Finalmente, se agregaron 0,5 U de PNGasa F y se incubó durante toda la noche a 37°C, realizando posteriormente un ensayo de *Western blot* para analizar los resultados obtenidos.

14.2. OBTENCIÓN DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES PRODUCTORAS DEL rhIFN- α 2b Y SUS VARIANTES MUTADAS

Con el fin de obtener líneas celulares estables productoras del rhIFN- α 2b *wild type* y de las muteínas seleccionadas en los ensayos de transfección transitoria, se realizaron lipofecciones de células CHO.K1 siguiendo el protocolo descrito en la sección 14. Luego de 72 h post-transfección, se cosecharon los sobrenadantes para evaluar la producción de rhIFN- α 2b y se comenzó la presión de selección. Para ello, se utilizó el medio A suplementado con SFB 5% (V/V) y el antibiótico geneticín o G-418 Sulfato (Gibco), el cual es un aminoglucósido de estructura similar a la neomicina. De esta manera, sólo aquellas células transfectadas con el plásmido pCI-neo que hayan incorporado en su genoma el gen de la neomicina fosfotransferasa, codificado en este vector, sobrevivirán en presencia de dicho antibiótico durante períodos de

tiempo prolongados. Una fracción de estas células también expresará el gen de interés, constituyendo una línea celular estable.

Durante la etapa de selección en presencia del antibiótico, se realizaron recambios de medio de cultivo cada 48 o 72 h, hasta observar la muerte de las células control, que se produjo aproximadamente a los 15 días desde el inicio de la selección.

15. CLONADO DE LÍNEAS CELULARES PRODUCTORAS DEL rhIFN- α 2b Y SUS MUTEÍNAS

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

El clonado celular de las líneas obtenidas se realizó mediante el método de dilución límite (Freshney, 2000c; Mather, 1991). El mismo consiste en preparar una suspensión celular de manera de obtener una única célula en una unidad de volumen de medio de cultivo, el cual luego es dispensado en pozos de una placa de microtitulación. La probabilidad estadística de obtener pocillos con un único clon se puede incrementar reduciendo la densidad de siembra a un nivel tal que permita depositar una proporción de una sola célula cada 5 o 10 cavidades. Debido a las bajas densidades celulares que se emplean en este tipo de clonado, el medio de cultivo debe contener suficiente cantidad de nutrientes y factores de crecimiento que no son aportados por las células vecinas como ocurre en los cultivos densos. Por este motivo, se suelen emplear altas concentraciones de SFB y/o medios condicionados por el crecimiento de otras células o capas de células alimentadoras. El clonado se considera efectivo cuando se observa crecimiento, como máximo, en el 30% de los pozos sembrados con una proporción de una célula cada 10 pozos y una célula por pozo.

Con este fin, se prepararon suspensiones celulares de las líneas a clonar en medio A suplementado con SFB 20% (V/V), cuyas concentraciones fueron 0,5 cél.ml⁻¹, 5 cél.ml⁻¹ y 50 cél.ml⁻¹. Se dividieron dos placas de 96 pozos en tres sectores, sembrando en cada uno de ellos 200 μ l por pozo de las correspondientes suspensiones celulares, de manera de obtener en cada placa la misma cantidad de pozos con un promedio de 0,1 células, 1 célula y 10 células.

En los pozos correspondientes a la siembra de 0,1 y 1 célula por pozo donde se detectó el crecimiento de una única colonia, se evaluó la expresión de rhIFN- α 2b mediante técnica de ELISA *sandwich* (sección 10.1.1). Los clones que mostraron mayor producción de rhIFN- α 2b fueron amplificados por duplicado a placas de 24 pozos. Una de las placas se destinó a la amplificación de los clones para su posterior criopreservación. La otra placa se utilizó para seleccionar los clones en base a su productividad celular. Para ello, los clones se sembraron en una densidad celular de 2.10⁵ cél.ml⁻¹, incubándose durante 24 h a 37°C. Posteriormente, se cosechó el sobrenadante y se determinó la concentración de rhIFN- α 2b presente en el mismo mediante técnica de ELISA *sandwich*. Por otro lado, se realizó el recuento celular, calculándose la productividad específica aproximada según la siguiente ecuación:

$$\text{Productividad específica (ng.10}^6 \text{cél}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}) = \frac{\text{Concentración de rhIFN-}\alpha\text{2b (ng.ml}^{-1})}{\frac{C_f + C_i}{2} \text{ (cél.ml}^{-1}) \times t \text{ (días)}} \times 10^6 \quad (9)$$

donde C_i es la concentración de células sembradas, C_f es la concentración de células al término de la incubación y t es el tiempo de incubación.

Además, con el objeto de seleccionar los clones productores de cada variante de rhIFN- α 2b con un mayor contenido de isoformas glicosiladas, los sobrenadantes correspondientes a cada clon fueron analizados por técnica de *Western blot*. Finalmente, se determinó la actividad biológica volumétrica antiviral de los sobrenadantes de cultivo de los clones productores de las diferentes muteínas y se calculó la actividad biológica específica utilizando la ecuación 8.

16. PRODUCCIÓN DEL rhIFN- α 2b Y SUS MUTEÍNAS MEDIANTE EL CULTIVO DE CLONES EN CONDICIONES DE ADHERENCIA

Con el fin de optimizar las condiciones de producción del rhIFN- α 2b y sus muteínas, se seleccionaron tres clones, uno de ellos productor de la proteína *wild type* (wt1F6) y dos productores de dos variantes de la citoquina con un sitio de *N*-glicosilación (P4N2F8 y D77N1C6), como modelo de estudio.

En primer lugar, se determinó la productividad específica de rhIFN- α 2b en las diferentes fases del crecimiento celular. Para ello, en placas de 6 pozos se sembraron por duplicado 200.000 cél.ml^{-1} de cada clon en medio A suplementado con SFB 5% (V/V) y se cultivó a 37°C. Luego de 48 h, se cosechó el sobrenadante de uno de los pozos para determinar la concentración de rhIFN- α 2b mediante técnica de ELISA *sandwich* y se realizó el recuento celular, determinándose así la productividad específica en fase de crecimiento exponencial mediante la ecuación 9. En el otro pozo, se reemplazó el sobrenadante por medio de cultivo fresco y se incubó durante otras 48 h. Se tomó el sobrenadante, se determinó la concentración de rhIFN- α 2b y se realizó el recuento celular. Se calculó la productividad específica en fase de crecimiento estacionaria mediante la ecuación 9, teniendo en cuenta que la C_i corresponde al recuento realizado en el primer pozo luego de 48 h transcurridas desde la siembra.

En segundo lugar, con el objeto de disminuir el costo de producción y facilitar la posterior purificación de las proteínas recombinantes, se evaluó la productividad específica de los clones en medio A suplementado con concentraciones decrecientes de SFB. Para ello, en placas de 24 pozos se sembraron por cuadruplicado 200.000 cél.ml^{-1} de cada clon en medio A suplementado con SFB 5% (V/V) y se incubó a 37°C hasta que las células alcanzaron la confluencia (fase estacionaria). Posteriormente, el sobrenadante de cultivo de los cuatro pozos de cada clon fue reemplazado por medio de cultivo A fresco suplementado con SFB 5, 1, 0,5 y 0,1% (V/V). Luego de 24 h, se cosechó el sobrenadante y se determinó la concentración de rhIFN- α 2b mediante técnica de ELISA *sandwich*. Además, se realizó el recuento celular de cada pozo y se calculó la productividad específica, considerando que, al encontrarse los cultivos en la fase estacionaria, $C_f \approx C_i$.

Por último, se seleccionó el clon D77N1C6 para determinar el intervalo de tiempo óptimo entre recambios de medio de cultivo con el objetivo de producir la mayor masa posible de la citoquina. En placas de 24 pozos, se sembraron 12 pozos con 150.000 cél.ml^{-1} en medio A suplementado con SFB 5% (V/V), incubándose a 37°C. Una vez que las células alcanzaron la

fase estacionaria de crecimiento, el sobrenadante condicionado de los 12 pozos se reemplazó por medio de cultivo A suplementado con SFB 0,5% (V/V). Se destinaron 8 pozos para realizar recambios cada 24 h y 4 pozos para realizar recambios cada 48 h. Luego de 24 h de incubación, se cosechó el sobrenadante de los 8 primeros pozos, se reemplazó por medio fresco y se realizó el recuento del primer pozo. Este paso se repitió cada 24 h, sacrificándose un pozo por vez para realizar el recuento celular. Por otro lado, el primer recambio de medio de cultivo en los 4 pozos restantes se llevó a cabo luego de 48 h de incubación, realizándose el recuento celular del primer pozo. El procedimiento se repitió de la misma manera cada 48 h. En total se realizaron ocho cosechas y sus correspondientes recambios de medio de cultivo cada 24 h y cuatro cosechas cada 48 h, en las cuales se evaluó la concentración de rhIFN- α 2b por ELISA *sandwich* y la productividad específica.

En las tres experiencias se evaluó la calidad de las proteínas producidas bajo las diferentes condiciones mediante valoración de la actividad biológica antiviral y ensayos de *Western blot*. De esta manera, se establecieron las condiciones óptimas de producción de las variantes de rhIFN- α 2b.

La producción de las diferentes muteínas de rhIFN- α 2b a mayor escala se realizó empleando frascos T triples de 500 cm² de superficie y/o botellas *roller* de 1.700 cm² (superficie extendida). Las células se inocularon en una concentración de 200.000 cél.ml⁻¹ en medio de cultivo A suplementado con SFB 5% (V/V) (200 ml para frascos T triples y 400 ml para botellas *roller*). Cuando las células alcanzaron la fase estacionaria, se cosechó el sobrenadante cada 48 o 72 h, reemplazándolo cada vez por medio de cultivo A suplementado con SFB 0,5% (V/V). Los sobrenadantes fueron centrifugados durante 10 min a 5.000 rpm y conservados a -20°C para su posterior purificación.

17. PURIFICACIÓN DEL rhIFN- α 2b Y SUS VARIANTES GLICOSILADAS A PARTIR DE SOBRENADANTES DE CULTIVO POR CROMATOGRAFÍA DE INMUNOAFINIDAD

La cromatografía de inmunoafinidad fue introducida en 1968 por Cuatrecasas y col. y constituye una poderosa herramienta para el aislamiento de proteínas. Bajo las condiciones adecuadas, se pueden obtener factores de purificación entre 1.000 y 5.000 veces en un único paso.

La cromatografía de inmunoafinidad puede dividirse en tres etapas:

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

17.1. MATERIAL DE PARTIDA

Las muestras conteniendo el rhIFN- α 2b *wild type* y las muteínas del rhIFN- α 2b con un sitio (rhIFN- α 2bD77N), dos sitios (rhIFN- α 2b2N), tres sitios (rhIFN- α 2b3N), cuatro sitios (rhIFN- α 2b4N) y cinco sitios (rhIFN- α 2b5N) de *N*-glicosilación fueron obtenidas mediante el cultivo de sus correspondientes clones en condiciones de adherencia (sección 16).

Los sobrenadantes de cultivo fueron filtrados utilizando un sistema de filtración por vacío que emplea membranas de acetato de celulosa de 0,45 μ m y 0,22 μ m (Nalgene, EE.UU) y portafiltras de 500 y 1.000 ml de capacidad (Nalgene).

17.2. EQUIPAMIENTO

Se empleó un cromatógrafo líquido de baja presión (*Fast Protein Liquid Chromatography System*, FPLC[®], GE Healthcare), equipado con un colector automático de fracciones (FRAC-100) y una unidad registradora (REC-102).

17.3. PARÁMETROS EVALUADORES DE LA *PERFORMANCE* DE LA PURIFICACIÓN

Un proceso de purificación consiste en una secuencia de operaciones en las cuales los contaminantes son subsecuentemente removidos, aumentando la cantidad de proteína de interés en relación a las demás proteínas.

Existen tres parámetros básicos a considerar en cada etapa de un proceso separativo:

- Actividad específica (AE)
- Factor de purificación (FP)
- Rendimiento o recuperación (R)

La actividad específica es un parámetro que evalúa en modo porcentual la presencia de la proteína de interés en una muestra compleja. La misma se calculó como el cociente entre la concentración de la proteína de interés (C_{PI}) y la concentración de proteínas totales (C_{PT}) (ecuación 10).

$$AE = \frac{C_{PI}}{C_{PT}} \quad (10)$$

El factor de purificación es el cociente entre la actividad específica de la muestra obtenida luego del proceso de purificación (AE_2) y la actividad específica previa de la muestra (AE_1). El FP se calculó utilizando la ecuación 11.

$$FP = \frac{AE_2}{AE_1} \quad (11)$$

El rendimiento o recuperación de la purificación fue calculado utilizando la ecuación 12, donde M_F representa la masa de proteína de interés recuperada en el proceso y M_I , la masa inicial presente en la muestra.

$$R (\%) = \frac{M_F}{M_I} \times 100 \quad (12)$$

17.4. PREPARACIÓN DE LAS MATRICES DE INMUNOAFINIDAD

A partir del panel de mAbs anti-rhIFN- α 2b se seleccionaron tres anticuerpos (CA1A3, CA5E6 y CB15D7) y se inmovilizaron en una matriz de *Sepharose* (GE Healthcare), con el fin de elegir el mAb más adecuado para llevar a cabo la purificación de las diferentes variantes de rhIFN- α 2b mediante cromatografía de inmunoafinidad.

17.4.1. AMPLIFICACIÓN DE HIBRIDOMAS PRODUCTORES DE MABS ANTI-rhIFN- α 2b. PRODUCCIÓN *IN VIVO* EN LÍQUIDO ASCÍTICO

Para la producción de líquido ascítico se empleó un lote de 8 ratones BALB/c hembras de 4 meses de edad por cada hibridoma seleccionado para su amplificación. La secuencia metodológica desarrollada para la obtención del líquido ascítico constó de las siguientes etapas:

- 1- Inoculación intraperitoneal de 0,5 ml de ácido 2,6,10,14-tetrametildecanoico (Pristane[®], Sigma), que actúa como sustancia irritante para el ratón, el que responde secretando nutrientes y reclutando monocitos y células linfoides en la zona peritoneal. De esta manera, se genera un ambiente muy favorable para la proliferación de las células tumorales (Harlow y Lane, 1988a).
- 2- Preparación de las células de hibridomas a inocular. Los hibridomas productores de los mAbs seleccionados fueron descongelados utilizando para su crecimiento una capa de células alimentadoras. Para la preparación de la misma, un ratón de la cepa BALB/c de 4 meses de edad anestesiado en atmósfera de éter etílico, se sacrificó por dislocación cervical y, en condiciones estériles, se extrajo el bazo. Se lavó con medio de cultivo D-MEM, se disgregó mediante el empleo de tijera y pinza de cirugía y se filtró por un tamiz de malla fina de acero número 50 (Sigma). El filtrado se centrifugó a 1.000 rpm durante 10 min y, luego de descartar el sobrenadante, las células de bazo se resuspendieron en medio D-MEM suplementado con SFB 20% (V/V). Posteriormente, esta suspensión celular se dispuso en una placa de 12 pozos a razón de 1 ml por pozo. La descongelación de las células de hibridomas se realizó el día siguiente a la preparación de la capa de células alimentadoras.
- 3- Inoculación intraperitoneal de $2-5 \cdot 10^6$ células de hibridomas por animal, 10 días después de la administración de Pristane[®]. Para ello, el cultivo de hibridomas en fase de crecimiento exponencial fue centrifugado a 1.000 rpm durante 10 min y resuspendido en 5 ml de PBS de manera de inocular 0,5 ml de suspensión celular por ratón.
- 4- El líquido ascítico fue recolectado, aproximadamente, a partir de la primera semana posterior a la inoculación de los hibridomas. Los criterios determinantes del inicio de la extracción de ascitis fueron la presencia de un abdomen prominente y la consecuente dificultad locomotriz manifestada por el animal. El líquido se obtuvo por punción de la región intraperitoneal con aguja de 0,9 mm de diámetro, recolectándolo por goteo en un tubo cónico de 50 ml.
- 5- El líquido ascítico fue centrifugado a 1.500 rpm durante 10 min y el sobrenadante fue conservado a -20°C .
- 6- La concentración de Igs totales en el fluido ascítico se determinó mediante técnica de ELISA *sandwich* (sección 17.4.2).

17.4.2. CUANTIFICACIÓN DEL LIGANDO DE AFINIDAD

La cuantificación de los mAbs presentes en las ascitis murinas y en las muestras purificadas se realizó por un procedimiento de ELISA *sandwich*, el cual se describe a continuación:

- 1- Sensibilización: Placas de poliestireno de fondo plano de 96 pozos fueron sensibilizadas con 100 μl de una solución de anticuerpos de conejo anti-inmunoglobulinas murinas (DAKO) diluidas 1:2.000 en solución de sensibilización. Se incubó durante 1 h a 37°C y toda la noche a 4°C .
- 2- Bloqueo: El bloqueo de los sitios de interacción inespecífica se realizó con 200 μl por pozo de solución de bloqueo. Se incubó durante 1 h a 37°C .

- 3- Primera incubación: En los pozos correspondientes se agregaron 100 μl de diluciones sucesivas 1:2 del estándar de IgG de ratón (Sigma) en solución diluyente desde 400 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ hasta 0,39 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Las muestras se ensayaron realizando diluciones seriadas al medio, de manera de poder compararlas con el estándar en el rango de linealidad de la curva. Se incubó durante 1 h a 37°C.
- 4- Segunda incubación: Se agregaron 100 μl de anticuerpos de conejo anti-inmunoglobulinas murinas conjugados con la enzima peroxidasa en una dilución 1:500 en solución diluyente. Se incubó durante 1 h a 37°C.
- 5- Reacción reveladora: Se repitió el procedimiento indicado en la sección 10.1.1.
- 6- Cuantificación: Se realizó según lo indicado en la sección 10.1.1.

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

17.4.3. PURIFICACIÓN DEL LIGANDO DE AFINIDAD

La purificación de los mAbs a partir del fluido ascítico se realizó mediante cromatografía de afinidad a proteína A de acuerdo con la siguiente metodología (Ey y col., 1978):

- 1- Armado de la columna: un volumen de 5 ml de gel de *rProtein A SepharoseTM Fast Flow* (GE Healthcare) se empaquetó en soporte plástico *Econo-Pac Column* (BioRad) (1,5 x 2,8 cm).
- 2- Equilibrado: la matriz se equilibró con solución de Tris 1 M, NaCl 3 M, pH 9. Para esta etapa se emplearon 5 volúmenes de columna (VC), verificándose que el pH a la salida de la columna sea igual al de la solución de equilibrado.
- 3- Acondicionamiento de la muestra: el líquido ascítico se centrifugó a 5.000 rpm durante 5 min y el sobrenadante se ajustó a una concentración de NaCl 3 M, pH 9 mediante el agregado de NaCl sólido y solución de Tris 1 M pH 9 en una proporción volumétrica 10:1. Posteriormente, la muestra se filtró a través de una membrana de acetato de celulosa de 0,45 μm mediante un sistema de vacío.
- 4- Siembra: la muestra se aplicó a la matriz teniendo en cuenta su capacidad y la concentración de Igs presentes en el fluido ascítico. Se respetó una relación de 10 mg de Igs por cada ml de gel.
- 5- Lavado: las proteínas no retenidas por la matriz cromatográfica fueron eliminadas mediante el lavado de la misma con solución de Tris 1 M, NaCl 3 M, pH 9, hasta demostrar la ausencia de proteínas por medición espectrofotométrica a $\lambda=280$ nm.
- 6- Elución: las Igs retenidas fueron eluidas mediante descenso del pH del lecho cromatográfico. Para tal fin, se empleó una solución de ácido cítrico 0,1 M, pH 3. Se recolectaron fracciones de 1 ml y se neutralizaron con 250 μl de solución de Tris 1 M, pH 9. Se mezclaron las fracciones correspondientes al pico de elución, las cuales fueron monitoreadas por lectura de absorbancia a $\lambda=280$ nm. El volumen total obtenido fue dializado contra solución de NaCl 0,5 M en NaHCO_3 0,1 M, pH 8,3, con el objeto de acondicionar los anticuerpos para su acoplamiento a una matriz de *Sepharose* activada con bromuro de cianógeno.

El flujo establecido durante las distintas etapas del proceso cromatográfico fue de 0,5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ (0,28 $\text{cm}\cdot\text{min}^{-1}$).

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

$$\text{Concentración de Ig (mg.ml}^{-1}\text{)} = 10 \times \left(E_{1\text{cm}}^{1\%}\right)^{-1} \times A_{280\text{nm}} \quad (13)$$

La pureza de los anticuerpos se evaluó mediante SDS-PAGE (sección 12.1) con posterior coloración con azul brillante de Coomasie. Para ello, luego de la corrida electroforética, el gel se sumergió durante 10 min en solución de coloración [azul brillante Coomasie R-250 0,1% (P/V) en metanol 40% (V/V) y ácido acético 10% (V/V)]. Posteriormente, se decoloró con solución de metanol 7,5% (V/V) y ácido acético 5% (V/V) hasta aparición de bandas nítidas y disminución de la tinción de fondo.

17.4.4. INMOVILIZACIÓN DEL LIGANDO DE AFINIDAD

Los mAbs fueron acoplados a una matriz de *Sepharose*TM 4B activada con bromuro de cianógeno (GE Healthcare), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Se utilizaron 2 ml de resina para cada experiencia. El porcentaje de acoplamiento de los mAbs a la resina se calculó por medida de la concentración de Igs en la solución antes y después de la reacción de acoplamiento.

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

17.5. PROTOCOLOS DE PURIFICACIÓN DEL rhIFN- α 2b Y SUS VARIANTES GLICOSILADAS POR CROMATOGRAFÍA DE INMUNOAFINIDAD

17.5.1. PROTOCOLO PARA EVALUAR LA *PERFORMANCE* DE LOS DIFERENTES MABS

Para evaluar la *performance* de las resinas CA1A3-, CA5E6- y CB15D7-*Sepharose*, se utilizó sobrenadante de cultivo conteniendo la muteína rhIFN- α 2bD77N, llevando a cabo el siguiente protocolo de purificación:

- 1- Armado de las columnas: un volumen de 2 ml de cada resina se empaquetó en una columna XK 16/20 (1,6 x 1 cm) (GE Healthcare).
- 2- Equilibrado: la matriz se equilibró con 5 VC empleando una solución de Tris 25 mM, Tritón X-100 0,3% (V/V), pH 7,5 (solución de equilibrado), a un flujo de 1 ml.min⁻¹ (0,5 cm.min⁻¹).
- 3- Acondicionamiento de la muestra: el sobrenadante de cultivo fue acondicionado mediante el agregado de Tritón X-100 hasta alcanzar una concentración final de 0,3% (V/V). El pH se ajustó a un valor de 7,5 mediante el agregado de HCl o NaOH diluido, según fuese necesario. La muestra se filtró como se indica en el punto 17.1.
- 4- Siembra: se sembraron 30 ml de muestra en cada columna a un flujo de 0,25 ml.min⁻¹ (0,12 cm.min⁻¹). El volumen de exclusión de la columna (*flowthrough*) se recogió en fracciones para su posterior análisis.
- 5- Lavados: la matriz se lavó con 5 VC de cada una de las siguientes soluciones:

- Lavado 1: solución de Tris 25 mM pH 7,5, NaCl 0,5 M, Tritón X-100 0,2% (V/V) (solución de lavado 1).
- Lavado 2: solución de Tris 25 mM pH 7,5, NaSCN 1 M, Tritón X-100 0,1% (V/V) (solución de lavado 2).
- Lavado 3: solución de NaCl 0,15 M (solución de lavado 3).

El flujo de lavado fue de $0,25 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, recogiéndose fracciones para su posterior análisis.

- 6- Elución: el rhIFN- α 2bD77N se recuperó con una solución de NaCl 0,15 M en ácido acético 0,2 M, pH 3, a un flujo de $0,25 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Se recolectaron fracciones de 2 ml, las cuales fueron neutralizadas mediante el agregado de 200 μl de solución de Tris 1 M, pH 9 y conservadas para su posterior análisis.
- 7- Regeneración y conservación de la matriz: se utilizaron 5 VC de una solución de Tris 25 mM pH 7,5, cloruro de guanidina 0,3 M, a un flujo de $0,25 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Se recogió en una única fracción, la cual se concentró hasta un volumen de 1 ml y se diafiltró según se indica en la sección 17.6. Finalmente, la matriz se lavó con 5 VC de una solución de Tris 25 mM pH 7,5, azida 0,02% (V/V) (solución de conservación), conservándose en estas condiciones a 4°C .

17.5.2. EVALUACIÓN DE DIFERENTES CONDICIONES DE ELUCIÓN PARA LA RESINA CA5E6-SEPHAROSE

Una vez seleccionado el mAb adecuado para realizar la purificación del rhIFN- α 2b y sus derivados, se analizó la capacidad eluyente de diferentes soluciones con el fin de optimizar la recuperación de la citoquina. Para ello, se realizaron 8 experiencias de purificación, utilizando la 2 ml de matriz CA5E6-*Sepharose* empaquetada en el soporte XK 16/20, de acuerdo con el siguiente protocolo:

- 1- Equilibrado: la matriz se equilibró con 5 VC de solución de equilibrado a un flujo de $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.
- 2- Siembra: se sembraron 30 ml de sobrenadante conteniendo la muteína rhIFN- α 2bD77N, acondicionado según se indica en el punto 3 de la sección 17.5.1, a un flujo de $0,25 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.
- 3- Lavados: la matriz se lavó con 5 VC de solución de lavado 1 y con 5 VC de solución de PBS, a un flujo de $0,25 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.
- 4- Elución: el rhIFN- α 2bD77N retenido se recuperó aplicando, alternativamente, 20 VC de las siguientes soluciones eluyentes, a un flujo de $0,25 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$:
 - Solución de NaCl 0,5 M en ácido acético 0,2 M, pH 3.
 - Solución de LiCl 5 M en Tris 25 mM, pH 7,5.
 - Solución de etilenglicol 50% (V/V) en Tris 25 mM, pH 7,5.
 - Solución de glicina 100 mM, pH 10,5.
 - Solución de glicina 100 mM, pH 2,5: se realizaron dos experiencias empleando esta solución. La primera experiencia se realizó siguiendo el protocolo habitual. La segunda consistió en realizar la elución mediante detención del flujo. Para ello, se adicionaron 2 ml de solución de elución a la matriz, se incubó durante 10 min y se recogió el eluato en un tubo conteniendo 200 μl de Tris 1 M, pH 9. Este procedimiento se repitió 4 veces.

- Solución de glicina 100 mM, pH 2,5 con el agregado de dioxano 10% (V/V).
 - Solución de glicina 100 mM, pH 2.
- 5- La matriz se lavó con 5 VC de solución de conservación, preservándose a 4°C hasta su reutilización.

Posteriormente, se determinó la concentración de la citoquina en todas las fracciones mediante técnica de ELISA *sandwich*.

17.5.3. PROTOCOLO FINAL DE PURIFICACIÓN EMPLEANDO LA RESINA CA5E6-SEPHAROSE

La purificación del rhIFN- α 2b *wild type* y de las muteínas de interés a partir de sus correspondientes sobrenadantes (sección 17.1), se realizó empleando una alícuota de matriz CA5E6-*Sepharose* diferente para cada variante de rhIFN- α 2b, de manera de evitar la contaminación cruzada entre ellas. Para todas las variantes se empleó la columna XK 16/20 con 2 ml de matriz, con excepción de la muteína con cuatro sitios de *N*-glicosilación (rhIFN- α 2b4N), para la cual se utilizó la columna XK 26/20 (GE Healthcare) con 15 ml de matriz (2,6 x 2,8 cm), debido a la necesidad de procesar grandes volúmenes de muestra. El protocolo optimizado se describe a continuación:

- 1- Equilibrado: la matriz se equilibró con 5 VC de solución de equilibrado a un flujo de 1 ml.min⁻¹ (0,5 cm.min⁻¹) para la columna XK 16/20 y de 2 ml.min⁻¹ (0,4 cm.min⁻¹) para la columna XK 26/20.
- 2- Siembra: se sembró un volumen de muestra acondicionada (punto 3 de la sección 17.5.1) de manera de no exceder la capacidad de la columna, a un flujo lineal aproximado de 1 cm.min⁻¹ (flujo volumétrico de 2 ml.min⁻¹ para la columna XK 16/20 y de 4 ml.min⁻¹ para la columna XK 26/20). El *flowthrough* se recolectó en fracciones para su posterior análisis.
- 3- Lavados: la matriz se lavó con 5 VC de cada una de las siguientes soluciones:
 - Lavado 1: solución de Tris 25 mM, pH 7,5, NaCl 0,5 M, Tritón X-100 0,2% (V/V)
 - Lavado 2: solución de NaCl 0,15 MEl flujo de lavado fue igual al flujo de equilibrado para ambas columnas. Cada lavado se recogió en fracciones para su posterior análisis.
- 4- Elución: las diferentes variantes del rhIFN- α 2b retenidas fueron eluidas por descenso de pH. Para tal fin, se emplearon 10 VC de una solución de glicina 100 mM, pH 2, al mismo flujo de equilibrado. Para las purificaciones a pequeña escala, se recolectaron fracciones de 2 ml, las cuales fueron neutralizadas con 225 μ l de Tris 1 M, pH 9. En la purificación del rhIFN- α 2b4N, se recolectaron fracciones de 5 ml, las cuales fueron neutralizadas con 550 μ l de Tris 1 M, pH 9. Todas las fracciones fueron conservadas a -20°C para su posterior análisis.
- 5- Conservación de la matriz: la matriz se lavó con 5 VC de solución de conservación y se guardó a 4°C hasta su reutilización.

17.6. CONCENTRACIÓN Y DIAFILTRACIÓN DE LA PROTEÍNA

Las fracciones correspondientes al pico de elución de las diferentes purificaciones se mezclaron, se concentraron y se diafiltraron con agua ultra pura. Para ello, se utilizaron diferentes dispositivos según el volumen de muestra a procesar, todos equipados con

membranas de ultrafiltración de 10 kDa. Para procesar volúmenes de hasta 8 ml se emplearon unidades de filtración para centrífuga Amicon® Ultra-4 (Millipore). Para volúmenes de hasta 30 ml de muestra se utilizaron filtros para centrífuga Amicon® Ultra-15 (Millipore). Para la concentración y diafiltración de volúmenes mayores, se utilizó una celda de ultrafiltración con agitación magnética Amicon® (Millipore).

17.7. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

La cuantificación de proteínas totales se llevó a cabo empleando el método de Bradford (1976). El fundamento del mismo consiste en el desplazamiento del máximo de absorbancia del colorante azul brillante de *Coomassie* en la zona de longitudes de onda comprendida entre 595 y 620 nm, luego de su unión con los aminoácidos básicos Arg y Lys presentes en la proteína. La intensidad del color generado es directamente proporcional a la concentración de tales aminoácidos y por lo tanto de las proteínas presentes en la muestra analizada. Este ensayo es ampliamente aplicable a la cuantificación de la mayoría de las proteínas, con excepción de pequeños polipéptidos básicos y soluciones proteicas que contienen detergentes iónicos o no iónicos en concentraciones superiores al 0,2% (P/V).

La técnica se realizó en microescala empleando placas de microtitulación. Se preparó una curva de calibración utilizando BSA como estándar. Para ello, se realizaron sucesivas diluciones 1:10 de una solución de BSA (desde 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ hasta 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y se dispensaron por duplicado 20 μl por pozo de cada dilución. En otros pozos, se dispensaron por triplicado 20 μl de cada una de las muestras. Posteriormente, se adicionaron 200 μl de la solución del colorante [azul brillante de *Coomassie* G-250 (Sigma) 0,01% (P/V), alcohol etílico 4,75% (V/V), ácido fosfórico 8,5% (P/V)] a todos los pozos. Se incubó durante 10 min a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a $\lambda=620$ nm en un lector de placas de microtitulación. La concentración de proteínas totales en las muestras incógnitas se calculó mediante interpolación de los valores de absorbancia obtenidos para cada muestra en la curva de calibración.

17.8. DETERMINACIÓN DE LA PUREZA MEDIANTE TÉCNICA DE SDS-PAGE CON POSTERIOR TINCIÓN ARGÉNTICA

La determinación del porcentaje de pureza de las muestras se llevó a cabo mediante técnica de SDS-PAGE (sección 12.1) con posterior tinción argéntica. Para tal fin se utilizó el *kit Silver Stain Plus* (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se realizó la densitometría de las bandas coloreadas empleando un *scanner* para densitometría (ImageScanner, GE Healthcare) y el *software* ImageMaster TotalLab V1.11 (GE Healthcare).

18. EVALUACIÓN DE LA FARMACOCINÉTICA DE LAS VARIANTES DEL rhIFN- α 2b EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Con el propósito de evaluar la influencia de la porción glicosídica sobre los parámetros farmacocinéticos de las muteínas del rhIFN- α 2b, se realizaron experimentos *in vivo* utilizando animales de experimentación. Los estudios se efectuaron en comparación con la molécula de rhIFN- α 2b no glicosilada producida en bacterias, la proteína *wild type* (con un sitio de *O*-glicosilación) y la variante conjugada covalentemente con una molécula de polietilenglicol (PEG) de 12 kDa (rhIFN- α 2b-PEG12kDa, Schering-Plough), utilizando la vía de inyección

endovenosa y subcutánea. Todas las variantes glicosiladas se obtuvieron mediante producción en células CHO.K1 (sección 16) y purificación mediante cromatografía de inmovilización de afinidad empleando la resina CA5E6-*Sepharose* (sección 17.5.3).

18.1. VÍA DE INOCULACIÓN ENDOVENOSA

El estudio farmacocinético utilizando la vía endovenosa se llevó a cabo para el rhIFN- α 2b no glicosilado, el rhIFN- α 2b-PEG12kDa, una representante de las variantes con un sitio de *N*-glicosilación (rhIFN- α 2b1N) y la muteína con cuatro sitios de *N*-glicosilación (rhIFN- α 2b4N).

Se emplearon ratas Wistar hembras, de dos meses de edad, con un peso promedio de 200 g (Comisión Nacional de Energía Atómica, Argentina), las cuales fueron mantenidas en un bioterio a una temperatura controlada de 24°C y un fotoperíodo luz/oscuridad de 12 h, proporcionándoles agua y comida *ad-libitum*. Las ratas fueron separadas en cuatro lotes de cuatro animales cada uno e inyectadas en la vena de la cola con una dosis única de 1 μ g de cada variante de rhIFN- α 2b. Se recolectaron muestras de sangre (aproximadamente 500 μ l) a diferentes tiempos post-inyección mediante punción de la vena retroorbital empleando capilares heparinizados. Cada muestra fue centrifugada a 5.000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente con el fin de separar el plasma, el cual fue conservado a -20°C hasta su posterior utilización.

La cuantificación de la citoquina en las muestras se realizó mediante valoración de su actividad biológica antiviral volumétrica (sección 11.1). Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de actividad biológica remanente en cada muestra con respecto a las unidades de actividad biológica de rhIFN- α 2b suministradas a cada rata y se graficó dicho porcentaje en función del tiempo transcurrido desde su inoculación.

La eliminación plasmática se analizó sobre la base de un modelo matemático, que permitió procesar los datos experimentales para calcular los parámetros farmacocinéticos correspondientes a cada molécula estudiada. Los modelos más simples y útiles empleados en farmacocinética son los modelos compartimentales, los cuales analizan el comportamiento de la droga agrupando los tejidos corporales cinéticamente indistinguibles en compartimientos, y describen la transferencia de la droga entre los mismos en términos de constantes de velocidad. Estos modelos pueden clasificarse en monocompartimentales, cuando el organismo actúa como un único compartimiento donde el fármaco se distribuye en forma instantánea, y multicompartimentales. El comportamiento de las citoquinas se ajustó a un modelo bicompartimental, que considera que la droga se distribuye rápida y uniformemente en un compartimiento central o intravascular (representado por la sangre, los fluidos extracelulares y los tejidos altamente irrigados) y se equilibra más lentamente con un compartimiento periférico o extravascular (constituido por los tejidos con menor flujo sanguíneo) (Fig. 12) (Shargel y col., 2005a).

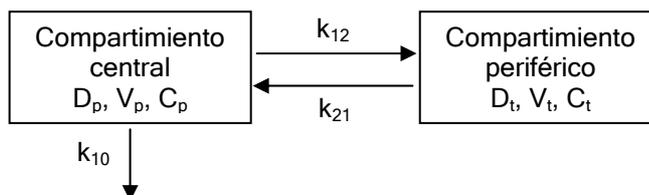


Fig. 12. Modelo abierto de dos compartimientos, inyección intravenosa.

La droga se distribuye en dos compartimientos que alcanzan el equilibrio y se elimina a través del compartimiento central (plasma). La letra D indica la cantidad de droga en el compartimiento central (p) y tisular (t), la letra V, el volumen de los compartimientos y la letra C, la concentración de la droga. Las constantes k_{12} y k_{21} son constantes de velocidad de transferencia entre compartimientos y la constante k_{10} es la constante de eliminación del compartimiento central hacia el exterior del sistema (Shargel y col., 2005a).

El modelo consiste en una simplificación de la compleja cinética de las drogas en el organismo, lo cual supone la aceptación de una serie de hipótesis:

- El sistema es abierto porque el fármaco puede ser eliminado del mismo.
- Los compartimientos no son una región fisiológica o anatómica, sino que son un conjunto de tejidos o fluidos que poseen similar flujo sanguíneo y afinidad por la droga.
- Se considera que la droga está uniformemente distribuida dentro de cada compartimiento.
- La transferencia de la droga entre compartimientos es un proceso reversible con una cinética de primer orden.

En el modelo de dos compartimientos, la curva de concentración plasmática de la droga en función del tiempo transcurrido desde su inyección tiene una forma biexponencial decreciente, la cual resulta de la suma de dos procesos de primer orden: distribución y eliminación (Fig. 13A). Este modelo asume que, a tiempo cero, no existe droga en el compartimiento tisular. Luego de una inyección endovenosa, la droga se equilibra rápidamente en el compartimiento central. La fase de distribución de la curva (o fase α) representa la remoción inicial de la droga del compartimiento central hacia el compartimiento periférico. Aunque la eliminación y la distribución ocurren simultáneamente durante la fase de distribución, existe una transferencia neta de la droga del compartimiento intravascular a los tejidos. Cuando la concentración tisular alcanza su valor máximo, que puede ser superior o inferior a la concentración plasmática, la velocidad de entrada de la droga a los tejidos iguala a la velocidad de salida, alcanzándose un equilibrio con la fracción de droga en el compartimiento central. En este momento, la concentración de la droga en ambos compartimientos disminuye en forma paralela (Fig. 13B). Esta disminución es un proceso de primer orden y se denomina fase de eliminación o fase beta (β). La mayoría de los modelos bicompartimentales asume que la eliminación ocurre desde el compartimiento central (Fig.12), ya que los principales sitios de depuración de fármacos son órganos altamente irrigados, como los riñones y el hígado. Las constantes k_{12} y k_{21} son constantes de velocidad de primer orden que gobiernan la velocidad de transferencia de la droga fuera y dentro del torrente sanguíneo, respectivamente, mientras que la constante k_{10} es la constante de eliminación del organismo.

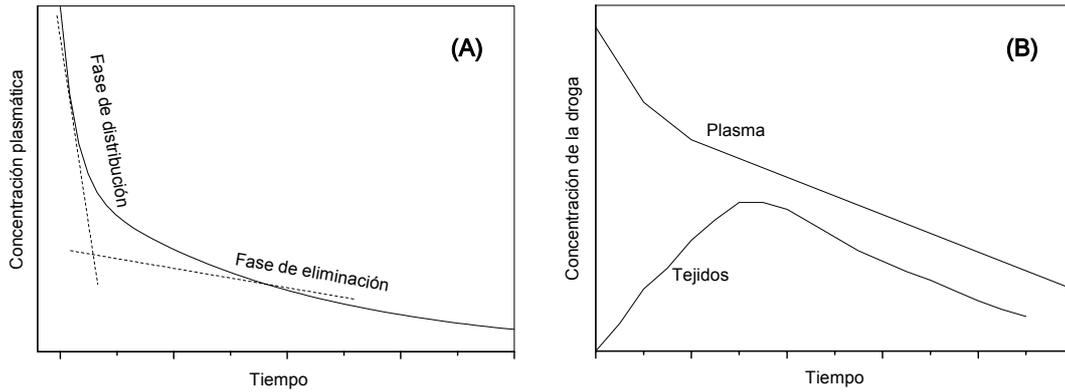


Fig. 13. Perfil plasmático y tisular de una droga inyectada mediante vía endovenosa cuyo comportamiento se ajusta a un modelo de dos compartimientos.

(A) La curva de concentración plasmática de la droga en función del tiempo transcurrido desde su inyección tiene una forma biexponencial decreciente que denota la existencia de dos procesos: distribución y eliminación. (B) La concentración de la droga en los tejidos alcanza un máximo, luego del cual disminuye en forma paralela a la concentración plasmática.

De esta manera, la variación de la concentración del fármaco en el plasma (C_p) en el tiempo puede ser descrita de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\frac{dC_p}{dt} = k_{21}C_t - k_{12}C_p - k_{10}C_p \tag{14}$$

donde C_t es la concentración del fármaco en los tejidos. Integrando la ecuación 14 se obtiene:

$$C_p = \frac{D_p^0}{V_p} \left(\frac{k_{21} - a}{b - a} e^{-at} + \frac{k_{21} - b}{a - b} e^{-bt} \right) \tag{15}$$

donde C_p es la fracción del fármaco remanente en la circulación al tiempo t , D_p^0 es la dosis inicial inyectada y a y b son constantes que dependen únicamente de k_{12} , k_{21} y k_{10} . La ecuación 15 puede ser transformada en la siguiente expresión:

$$C_p = Ae^{-at} + Be^{-bt} \tag{16}$$

Las constantes A y B son constantes híbridas que dependen de la dosis inicial, por lo que no tienen un significado fisiológico real. Las constantes a y b son constantes de velocidad para la fase de distribución y eliminación, respectivamente, y permiten el cálculo de los tiempos de vida media de distribución o fase α ($t_{1/2\alpha}$) y de eliminación o fase β ($t_{1/2\beta}$), de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$t_{1/2\alpha} = \frac{\ln 2}{a} = \frac{0,693}{a} \tag{17}$$

$$t_{1/2\beta} = \frac{\ln 2}{b} = \frac{0,693}{b} \tag{18}$$

Los datos experimentales se ajustaron a la función exponencial que describe la ecuación 15 utilizando el método de los residuales (Sección 18.3). Con los datos obtenidos, se pueden determinar ciertos parámetros farmacocinéticos, mediante la correcta sustitución de las constantes a , b , A y B en las ecuaciones 17, 18, 19, 20 y 21:

$$k_{10} = \frac{ab(A+B)}{Ab+Ba} \quad (19)$$

$$k_{12} = \frac{AB(b-a)^2}{(A+B)(Ab+Ba)} \quad (20)$$

$$k_{21} = \frac{Ab+Ba}{A+B} \quad (21)$$

En general, una droga se equilibra rápidamente en el cuerpo. Sin embargo, cada tejido individual puede tener una concentración distinta de medicamento debido a las diferencias en la afinidad hacia el mismo. El volumen de distribución (V_D) es un parámetro útil que relaciona la concentración plasmática con la cantidad total de droga en el organismo. El volumen de distribución puede considerarse como el volumen "aparente", dado que no tiene un significado fisiológico en términos de espacio anatómico, en el cual se disuelve la droga. Aquellas drogas cuya distribución extravascular es amplia poseen un V_D grande, mientras que para compuestos polares de baja solubilidad lipídica, V_D generalmente es pequeño.

El volumen del compartimiento central (V_p) o volumen de distribución inicial es útil para determinar la concentración de la droga inmediatamente después de una inyección intravenosa. A tiempo cero, no se produce eliminación de la droga, por lo que:

$$V_p = \frac{D_p^0}{C_p^0} \quad (22)$$

donde D_p^0 es la dosis inyectada por vía endovenosa y C_p^0 , la concentración plasmática a tiempo cero. En este mismo momento, dado que $t=0$, entonces $e^0=1$, por lo que la ecuación 16 se reduce a la siguiente expresión:

$$C_p^0 = A + B \quad (23)$$

Reemplazando en la ecuación 22, se obtiene la expresión 24, que permite calcular V_p mediante la determinación de A y B:

$$V_p = \frac{D_p^0}{A+B} \quad (24)$$

En el estado estacionario, la velocidad de entrada al compartimiento tisular o periférico desde el compartimiento central es igual a la velocidad de salida, por lo que:

$$D_t k_{21} = D_p k_{12} \quad (25)$$

La cantidad total de droga en el estado estacionario es igual a la suma de la cantidad de droga en el compartimiento tisular (D_t) y la cantidad de droga en el compartimiento central (D_p). Por lo tanto, el volumen de distribución aparente en el estado estacionario, $(V_D)_{SS}$, se puede calcular dividiendo la cantidad total de droga en el organismo por la concentración de la droga en el compartimiento central en este mismo estado:

$$(V_D)_{SS} = \frac{D_p + D_t}{C_p} \quad (26)$$

Reemplazando D_p como $V_p C_p$ en las ecuaciones 25 y 26 se obtiene una expresión de gran utilidad para determinar $(V_D)_{SS}$:

$$(V_D)_{SS} = V_p + \frac{k_{12}}{k_{21}} V_p \quad (27)$$

La magnitud de $(V_D)_{SS}$ depende de factores hemodinámicos responsables de la distribución de la droga y de las propiedades físicas de la misma, las cuales determinan la cantidad intra o

extravascular relativa que permanece en el cuerpo. Por lo tanto, constituye un parámetro importante cuando se comparan drogas con características diferentes.

Otro parámetro importante que describe a una droga en un sistema dado es su depuración del organismo o *clearance*. El *clearance* es una medida de la eliminación del fármaco del organismo que no requiere identificar los mecanismos involucrados. Se define como el volumen de plasma que es depurado de la droga por unidad de tiempo. Este parámetro puede ser calculado sin tener en cuenta el tipo de modelo, por lo que puede verse como un concepto fisiológico de remoción del fármaco. El *clearance* (CL) se calculó desde un enfoque no compartimental como la dosis inyectada, D_0 , dividido el área bajo la curva de concentración de la droga en plasma en función del tiempo, AUC (ecuación 28).

$$CL = \frac{D_0}{[AUC]_t^0} \quad (28)$$

Para la evaluación farmacocinética de cada variante de rhIFN- α 2b se determinaron los parámetros $t_{1/2\alpha}$, $t_{1/2\beta}$, CL y $(V_D)_{SS}$ para cada animal utilizado en el ensayo y se expresaron como el valor promedio \pm SD (n=4). El análisis estadístico de las diferencias entre los parámetros obtenidos para cada molécula se realizó empleando el test *t* de Student, considerando la existencia de diferencias significativas cuando $p < 0,05$. La comparación de medias de más de dos variables se realizó mediante el análisis estadístico de la varianza (ANOVA), previa comprobación de la homocedasticidad, con el fin de evitar el error inherente a la realización de múltiples test *t*.

18.2. VÍA DE INOCULACIÓN SUBCUTÁNEA

El estudio de la farmacocinética empleando la vía subcutánea se realizó para las variantes rhIFN- α 2b no glicosilado, rhIFN- α 2b *wild type*, rhIFN- α 2b-PEG12kDa y las muteínas con un sitio (rhIFN- α 2b1N), dos sitios (rhIFN- α 2b2N), tres sitios (rhIFN- α 2b3N), cuatro sitios (rhIFN- α 2b4N) y cinco sitios (rhIFN- α 2b5N) de *N*-glicosilación.

Se emplearon ratas Wistar hembras, de dos meses de edad, con un peso promedio de 200 g, las cuales fueron separadas en ocho lotes de tres animales cada uno, manteniéndolas bajo las mismas condiciones descritas en la sección 18.1. Los animales de cada lote fueron inyectados por vía subcutánea con una dosis única de $5 \cdot 10^5$ UI.kg⁻¹ de peso corporal del animal de cada variante de rhIFN- α 2b. Las muestras de sangre se recolectaron a diferentes tiempos post-inyección mediante punción de la vena retroorbital con capilares heparinizados. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 5.000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente y el plasma fue separado y conservado a -20°C para su posterior análisis.

La cuantificación de la citoquina en el plasma se realizó mediante valoración de su actividad biológica antiviral volumétrica (sección 11.1). Con los datos obtenidos se graficó la actividad biológica de cada muestra en función del tiempo transcurrido desde la inoculación de la molécula.

La curva obtenida se analizó estableciendo un paralelismo con la vía de administración oral, ya que los conceptos básicos para todas las rutas extravasculares son semejantes (Shargel y col., 2005b).

En comparación con la vía endovenosa, la farmacocinética de una droga suministrada por vía extravascular es más difícil de modelar. Los modelos farmacocinéticos para las vías extravasculares deben tener en cuenta la absorción sistémica del fármaco desde el sitio de administración hacia el plasma. Además, la administración extravascular se complica debido a

variables en el sitio de absorción, incluyendo posible degradación de la droga y diferencias significativas en la velocidad y grado de absorción entre individuos.

La complejidad del modelo farmacocinético que se elige para describir el comportamiento de una droga varía con la vía de administración, la duración de la distribución en tejidos y otros líquidos corporales y el proceso de eliminación. Si la distribución del medicamento es rápida, luego de su administración a través de una vía extravascular este proceso se realizará durante la fase de absorción y no se distinguirá la fase de distribución. Por ejemplo, la teofilina sigue una cinética monocompartimental luego de la administración oral, pero luego de una inyección intravenosa, su comportamiento se ajusta a un modelo de dos compartimientos.

El modelo de absorción de primer orden se aplica principalmente a la administración oral, intramuscular o subcutánea de soluciones acuosas de fármacos. Este modelo asume que, si la distribución de un fármaco es instantánea, tanto la velocidad global de absorción como la velocidad de eliminación, se pueden describir como procesos de primer orden.

En el caso de una droga administrada en forma oral, la velocidad de desaparición de la droga en el tracto gastrointestinal (GI) se describe como:

$$\frac{dD_{GI}}{dt} = -Fk_a D_{GI} \quad (29)$$

donde D_{GI} es la cantidad de droga en solución en el tracto gastrointestinal a cualquier tiempo t , k_a es la constante de velocidad de absorción de primer orden y F es la fracción de fármaco absorbida. Integrando la ecuación 29 se obtiene:

$$D_{GI} = D_0 e^{-k_a t} \quad (30)$$

donde D_0 es la dosis de la droga. Si la distribución es instantánea, el comportamiento de la droga una vez absorbida se puede ajustar a un modelo cinético de un compartimiento, por lo que la velocidad de eliminación de la droga del organismo se puede expresar como $-k_e D_B$, donde D_B es la cantidad de droga en el cuerpo en el tiempo t y k_e es la constante de eliminación de primer orden. La proporción de cambio de la cantidad de droga en el organismo es la diferencia entre la velocidad de captación (absorción) y la de salida (eliminación), por lo que:

$$\frac{dD_B}{dt} = Fk_a D_{GI} - k_e D_B \quad (31)$$

Reemplazando D_{GI} por la ecuación 30, integrando y reordenando se obtiene la ecuación general que describe la variación de la concentración de una droga en plasma (C_p) a cualquier tiempo t luego de su administración extravascular:

$$C_p = \frac{Fk_a D_0}{V_D(k_a - k_e)} (e^{-k_e t} - e^{-k_a t}) \quad (32)$$

que en forma simplificada se transforma en:

$$C_p = A e^{-k_e t} - A e^{-k_a t} \quad (33)$$

En la Fig. 14 se muestra un perfil típico de la concentración de una droga en el cuerpo luego de una única dosis oral. La máxima concentración plasmática luego de la administración se denomina $C_{m\acute{a}x}$ y el tiempo necesario para alcanzar dicha concentración, $T_{m\acute{a}x}$, el cual es independiente de la dosis y depende de las constantes de absorción (k_a) y de eliminación (k_e).

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

$$\frac{dC_p}{dt} = \frac{Fk_aD_0}{V_D(k_a - k_e)} (k_e e^{-k_e t} - k_a e^{-k_a t}) = 0 \quad (34)$$

lo cual puede ser simplificado a:

$$k_e e^{-k_e t} = k_a e^{-k_a t} \quad (35)$$

Aplicando logaritmos, se obtiene una ecuación para la determinación de $T_{m\acute{a}x}$ (valor que luego se utiliza para el cálculo de $C_{m\acute{a}x}$ mediante la ecuación 33), la cual resulta útil cuando la toma de muestra se realiza en tiempos inapropiados:

$$T_{m\acute{a}x} = \frac{2,3 \log(k_a / k_e)}{k_a - k_e} \quad (36)$$

Los valores de A , k_a y k_e se determinaron empleando el método de los residuales (Sección 18.3). Estos datos se utilizaron posteriormente para el cálculo del tiempo de vida media terminal ($t_{1/2elim}$), de acuerdo con la siguiente expresión:

$$t_{1/2elim} = \frac{0,693}{k_e} \quad (37)$$

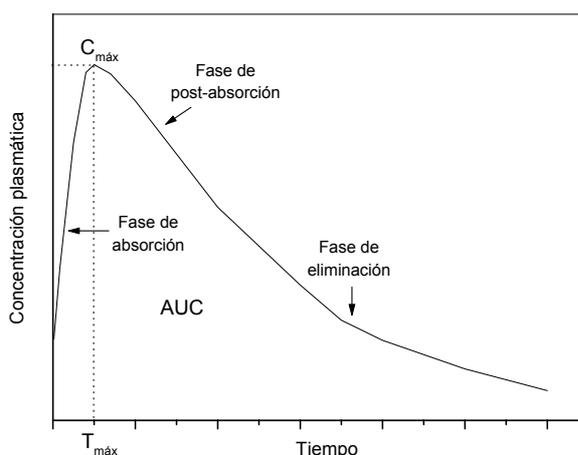


Fig. 14. Perfil plasmático de una droga inyectada mediante una vía extravascular. Se indican las fases de absorción y de eliminación de la curva (Shargel y col., 2005b).

La biodisponibilidad es una medida de la disponibilidad sistémica de una droga. Se refiere a la velocidad y grado en los cuales el principio activo de una droga se vuelve disponible en el sitio de acción. Se puede definir como la fracción de la dosis administrada de un fármaco que llega al plasma sanguíneo luego de los procesos de absorción y está disponible para cumplir su efecto farmacológico. Dentro de los factores que afectan la biodisponibilidad de un medicamento se encuentran el tipo de producto (solución, suspensión, etc.), la naturaleza de los excipientes, las propiedades fisicoquímicas de la molécula de fármaco y la vía de administración. La biodisponibilidad es la disponibilidad sistémica de una droga luego de una administración extravascular (por ejemplo, oral, sucutánea, intradérmica, etc.), en comparación con la dosis intravascular. La biodisponibilidad (F) se calculó en forma porcentual, mediante medición del área bajo la curva luego de la administración subcutánea (AUC)_{SC} y de la inyección intravenosa

$(AUC)_{IV}$, de acuerdo con la ecuación 38, donde $(D_0)_{SC}$ y $(D_0)_{IV}$ son las dosis inyectadas por vía subcutánea e intravascular, respectivamente. Para todas las rutas extravasculares, F siempre es igual o menor al 100%.

$$F(\%) = \frac{(AUC)_{SC}}{(AUC)_{IV}} \times \frac{(D_0)_{IV}}{(D_0)_{SC}} \times 100 \quad (38)$$

El *clearance* aparente (CL_{app}) de una droga administrada por una vía extravascular se define como el *clearance* determinado luego de una inyección endovenosa, CL, dividido por la biodisponibilidad calculada para la vía correspondiente, F. Reemplazando CL por la ecuación 28 y F por la ecuación 38, el cálculo del CL_{app} para la vía de inoculación subcutánea se reduce a la siguiente expresión:

$$CL_{app} = \frac{(D_0)_{SC}}{[(AUC)_{SC}]_t^0} \quad (39)$$

Los perfiles plasmáticos obtenidos para cada animal fueron analizados individualmente. Los parámetros farmacocinéticos $T_{máx}$, $C_{máx}$, $t_{1/2elim}$, AUC, CL_{app} y F se expresaron como el valor promedio \pm SD de los datos obtenidos para cada animal ($n=3$). Los parámetros farmacocinéticos de las diferentes moléculas fueron comparados utilizando el test *t* de Student o el ANOVA, según correspondiese, considerando la existencia de diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

18.3. ESTIMACIÓN DE PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS MEDIANTE EL MÉTODO DE LOS RESIDUALES

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

18.3.1. CÁLCULO DE PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS PARA UNA DROGA QUE SIGUE UN MODELO DE DOS COMPARTIMIENTOS LUEGO DE SU INYECCIÓN POR VÍA ENDOVENOSA

Luego de la inyección intravenosa de una droga que sigue una farmacocinética de dos compartimientos, la concentración plasmática declina en una forma biexponencial compleja. Cuando se grafica en una escala semilogarítmica el nivel plasmático del fármaco en función del tiempo se obtiene una línea curva que indica que la droga se distribuye en más de un compartimiento. En la misma se pueden identificar los procesos individuales de distribución y eliminación con el método de los residuales. Como se muestra en la Fig. 13A, la disminución de la concentración plasmática en la fase de distribución es mucho más rápida que en la fase de eliminación. Por lo tanto, en algún momento, el primer término de la ecuación 16 se aproximará a cero y la misma quedará reducida a la siguiente expresión:

$$C_p^t = Be^{-bt} \quad (40)$$

donde C_p^t representa la concentración plasmática a un tiempo tardío desde el momento de inyección. Aplicando logaritmos:

$$\log C_p^t = \frac{-bt}{2,3} + \log B \quad (41)$$

De la ecuación 41 se puede obtener la constante de velocidad, b , a partir de la pendiente de la recta que representa la fase exponencial terminal, y calcular el $t_{1/2\beta}$ mediante la ecuación 18. La ordenada al origen corresponde al logaritmo de la constante B .

Si se reemplaza la ecuación 40 en la ecuación 16 se obtiene:

$$C_p = Ae^{-at} + C_p^t \quad (42)$$

La recta que se obtiene graficando el logaritmo de la concentración plasmática residual ($C_p - C_p^t$) en función del tiempo representa la fase de distribución:

$$\log(C_p - C_p^t) = \frac{-at}{2,3} + \log A \quad (43)$$

a partir de la cual se pueden obtener los valores de a , $t_{1/2\alpha}$ y A .

18.3.2. CÁLCULO DE PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS PARA UNA DROGA QUE SIGUE UN MODELO DE UN COMPARTIMIENTO LUEGO DE SU INYECCIÓN POR VÍA SUBCUTÁNEA

El perfil plasmático de una droga administrada por una vía extravascular que es absorbida desde el sitio de inyección, distribuida en forma instantánea y posteriormente eliminada mediante una cinética de primer orden se describe de acuerdo con la ecuación 33. Si la constante de absorción k_a es mucho mayor que la constante de eliminación k_e , a tiempos tardíos la absorción de la droga será completa, por lo cual el segundo término de la ecuación 33 se acercará a un valor nulo. En este momento, la concentración plasmática se describirá según la siguiente expresión:

$$C_p^t = Ae^{-k_e t} \quad (44)$$

Aplicando logaritmos se obtiene la recta descrita por la ecuación 45, la cual permite el cálculo de la constante de eliminación k_e , a partir de la pendiente, y de la constante A , a partir de la ordenada al origen.

$$\log C_p^t = \frac{-k_e t}{2,3} + \log A \quad (45)$$

La constante de absorción k_a puede ser calculada a partir de la pendiente de la recta que resulta de la representación gráfica del logaritmo de la concentración plasmática residual en función del tiempo, como describe la ecuación 46.

$$\log(C_p^t - C_p) = \frac{-k_a t}{2,3} + \log A \quad (46)$$

19. CARACTERIZACIÓN DE LA MUTEÍNA CON CUATRO SITIOS DE *N*-GLICOSILACIÓN (rhIFN- α 2b4N)

19.1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA ANTITUMORAL *IN VIVO* DEL rhIFN- α 2b4N EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

La actividad antitumoral *in vivo* del rhIFN- α 2b4N fue evaluada mediante el estudio de su capacidad para disminuir el crecimiento de tumores sólidos implantados subcutáneamente en ratones inmunocomprometidos.

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

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

La línea tumoral prostática humana PC-3 fue utilizada para generar el modelo de tumor subcutáneo. Con este fin, las células se cultivaron en medio B y se cosecharon a partir de cultivos subconfluentes mediante desprendimiento enzimático con tripsina. Posteriormente, se lavaron con medio RPMI libre de suero, se contaron y finalmente se resuspendieron en un volumen de PBS de manera de obtener una densidad celular de 1.10^7 cél.ml⁻¹. Los ratones fueron inyectados por vía subcutánea en el flanco trasero izquierdo con 200 μ l de suspensión celular (2.10^6 células por animal). Dos días después de la implantación de las células tumorales, los ratones fueron divididos al azar en diferentes grupos para el comienzo del tratamiento.

En un experimento, los ratones fueron separados en tres grupos de siete animales cada uno, los cuales recibieron una inyección semanal subcutánea peritumoral de 3.10^5 UI de cada uno de los siguientes derivados de la citoquina: rhIFN- α 2b no glicosilado (grupo I), rhIFN- α 2b4N (grupo II) y rhIFN- α 2b-PEG-12kDa (grupo III).

En otra experiencia, se conformaron dos grupos de seis animales cada uno. El grupo I recibió tres inyecciones de 33.000 UI de rhIFN- α 2b no glicosilado por semana, mientras que el grupo II fue tratado con una única inyección de 1.10^5 UI de rhIFN- α 2b4N por semana, de manera de administrar la misma dosis semanal en ambas terapias.

La medición de las dimensiones de los tumores se llevó a cabo semanalmente previo al tratamiento utilizando un calibre. El cálculo del volumen tumoral se realizó asumiendo una

geometría elíptica, debido a que se ha encontrado que la fórmula de la elipsoide permite correlacionar adecuadamente el volumen con la masa del tumor (Tomayko y Reynolds, 1989). De acuerdo con ello, se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Volumen (cm}^3\text{)} = \frac{1}{2} \times L \times W^2 \quad (47)$$

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

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

19.2. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL rhIFN- α 2b4N EN PLASMA DE RATA

La estabilidad del rhIFN- α 2b4N frente a la acción de proteasas sanguíneas fue evaluada mediante su incubación en plasma de rata a 37°C. El estudio se realizó en comparación con el rhIFN- α 2b no glicosilado y la variante pegilada rhIFN- α 2b-PEG12kDa.

Se diluyeron 15 ng de cada una de las tres variantes de la citoquina en 300 μ l de plasma de rata, obtenido mediante clarificación de sangre recolectada sobre heparina por centrifugación durante 5 min a 5.000 rpm. El ensayo se llevó a cabo por triplicado, incubando cada preparación a 37°C durante tiempos variables. Para ello, se tomaron alícuotas a diferentes tiempos de incubación (0, 6, 24, 48, 72 y 96 h) las cuales fueron inmediatamente congeladas a -20°C.

Para evaluar la influencia de la temperatura de incubación sobre la estabilidad de las tres moléculas, el experimento fue repetido en las mismas condiciones, utilizando como solución diluyente BSA 0,1% (P/V) en PBS en reemplazo del plasma de rata.

La cuantificación de la citoquina activa en las diferentes muestras se realizó mediante valoración de la actividad biológica antiviral volumétrica (sección 11.1). Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de actividad biológica remanente en cada preparación a los diferentes tiempos de incubación con respecto a la actividad biológica inicial (tiempo cero) y se graficó dicho porcentaje en función del tiempo transcurrido desde el comienzo de la incubación. Los resultados obtenidos para cada molécula fueron comparados utilizando el test *t* de Student o el ANOVA, según correspondiese, considerando la existencia de diferencias significativas entre muestras cuando $p < 0,05$.

19.3. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL rhIFN- α 2b4N FRENTE A LA ACCIÓN DE PROTEASAS ESPECÍFICAS

Se estudió la estabilidad del rhIFN- α 2b4N luego del tratamiento con las proteasas tripsina y elastasa, en comparación con el rhIFN- α 2b no glicosilado y la variante pegilada rhIFN- α 2b-PEG12kDa.

El tratamiento con tripsina se llevó a cabo respetando la relación 1 ng de tripsina por cada 10 ng de la variante del rhIFN- α 2b correspondiente. Para ello, se prepararon 150 μ l de una solución 5 μ g. ml^{-1} de la citoquina en EDTA 1 mM en PBS, a la cual se le adicionaron 5 μ l de una

solución de tripsina (Gibco) $15 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ preparada en la misma solución. Las muestras se incubaron a 37°C durante diferentes tiempos (0, 1, 4, 7 y 24 h). La reacción fue detenida mediante el agregado de $1 \mu\text{l}$ de cóctel inhibidor de proteasas (Sigma) preparado según las recomendaciones del fabricante.

Para el tratamiento con elastasa, se utilizó una relación de 5 mU de proteasa por cada 1 ng de la variante del rhIFN- α 2b correspondiente. Para ello, se mezclaron $200 \mu\text{l}$ de una solución $100 \text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ de la citoquina con $10 \mu\text{l}$ de una solución de elastasa (Sigma) $10 \text{mU}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, ambas preparadas en PBS, y se incubó a 37°C . Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos (0, 1, 2,5, 4 y 7 h), las cuales se diluyeron 1:10 en medio MEM suplementado con SFB 10% (V/V) (medio de ensayo para valoración de actividad biológica antiviral) con el fin de detener la reacción.

En ambos casos, se realizaron controles de rhIFN- α 2b sin el agregado de proteasa. Todas las muestras fueron conservadas a -70°C hasta su análisis.

La cuantificación de la citoquina activa en las diferentes muestras se realizó mediante valoración de la actividad biológica antiviral volumétrica (sección 11.1). Con los datos obtenidos, se calculó el porcentaje de actividad biológica remanente a los diferentes tiempos de incubación con respecto a la actividad biológica a tiempo cero y se graficó dicho porcentaje en función del tiempo transcurrido desde el comienzo de la incubación. Los resultados obtenidos para cada molécula fueron comparados utilizando el test *t* de Student o el ANOVA, según correspondiese, considerando la existencia de diferencias significativas entre muestras cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. DESARROLLO DE MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DEL rhIFN- α 2b

En todo desarrollo de un proceso que involucre la producción de una proteína recombinante, es necesario contar con métodos precisos y de alta sensibilidad que permitan detectar y cuantificar la presencia de la misma en diferentes muestras. En condiciones ideales, las proteínas utilizadas como material de referencia o patrón deberían ser idénticas al analito que se desea cuantificar. Sin embargo, resulta evidente que durante el desarrollo de una molécula biológica nueva o una variante de una molécula natural no es posible cumplir este requerimiento.

En general, los ensayos empleados para la detección de citoquinas se dividen en tres grupos principales: inmunoensayos, bioensayos y métodos fisicoquímicos. Cada uno de ellos tiene sus ventajas y desventajas, las cuales dependen del tipo de muestra y de la información que se desea obtener (Mire-Sluis, 1999).

Con el objeto de disponer de un sistema para la cuantificación del rhIFN- α 2b y sus variantes glicosiladas durante las diferentes etapas involucradas en su obtención, se evaluaron diferentes metodologías según se tratase de sobrenadantes de cultivo o muestras de la citoquina purificada.

1.1. ENZIMOINMUNOENSAYOS (ELISAs)

Los enzimoinmunoanálisis (*enzyme-linked immunosorbent assays*, ELISAs) poseen la propiedad de ser altamente específicos, debido al uso de anticuerpos, y sensibles, debido al uso de enzimas que permiten amplificar la señal generada por el analito. Además, la metodología es simple, rápida y requiere poco equipamiento.

No obstante, una característica crucial para que el sistema se comporte en forma confiable es la identidad inmunológica del antígeno. Cualquier par de anticuerpos elegido para el diseño de un inmunoensayo resultará en un único perfil de reconocimiento. Así, si los anticuerpos empleados fueron generados utilizando como inmunógeno una proteína recombinante, no puede asegurarse que el ensayo reconocerá de la misma manera a la molécula natural o a variantes de la misma (Mire-Sluis y col., 1995a; Wadhwa y Thorpe, 1998).

Debido a la imposibilidad de contar previamente con la forma natural *O*-glicosilada del rhIFN- α 2b y las muteínas *N*-glicosiladas como inmunógenos para la preparación de anticuerpos, se procedió a utilizar un panel de mAbs dirigidos contra la molécula no glicosilada obtenida en *E. coli* para el diseño de diferentes esquemas de ELISA.

1.1.1. ELISA SANDWICH

Este ensayo consistió en la captura del Ag por parte de un mAb anti-rhIFN- α 2b adsorbido a la fase sólida y su posterior detección por anticuerpos policlonales específicos obtenidos en conejo. Finalmente, los mismos reaccionaron con un segundo anticuerpo conjugado con una enzima, que catalizó la transformación de su sustrato incoloro en una sustancia coloreada.

1.1.1.1. SELECCIÓN DE MABS DE CAPTURA

La ventaja de contar con una amplia batería de mAbs anti-rhIFN- α 2b no glicosilado reside en la posibilidad de encontrar anticuerpos capaces de reconocer epitopes de las variantes glicosiladas del rhIFN- α 2b que no hayan sido modificados por la presencia de carbohidratos y que exhiban, por lo tanto, la misma afinidad por sus epitopes homólogos a nivel de la citoquina no glicosilada. Esta propiedad permite el diseño de un sistema de cuantificación que demuestre la misma respuesta frente a concentraciones similares de analito (variantes glicosiladas) o sustancia de referencia (IFN no glicosilado). Para ello, fue necesario estudiar *a priori* el comportamiento individual de los 11 mAbs del panel como anticuerpos de captura de la molécula no glicosilada empleada como estándar de referencia.

En la Fig. 15 se muestran las curvas dosis-respuesta obtenidas para cada uno de los mAbs del panel, utilizando un rango de concentraciones de rhIFN- α 2b comprendido entre 0,0098 ng.ml⁻¹ y 20 ng.ml⁻¹ para un grupo de mAbs (A), y entre 0,488 ng.ml⁻¹ y 1.000 ng.ml⁻¹ para otro grupo de anticuerpos (B). Para cada uno de los mAbs de captura se realizó una única curva y seis reiteraciones de su correspondiente control negativo en ausencia de Ag. Es importante destacar que los ensayos de un único punto no resultan válidos, ya que no proveen la gran cantidad de información que se obtiene mediante una serie de diluciones que generan una curva dosis-respuesta. El análisis estadístico para determinar ciertos parámetros, como el límite de detección de la técnica, no es posible en ensayos de un único punto.

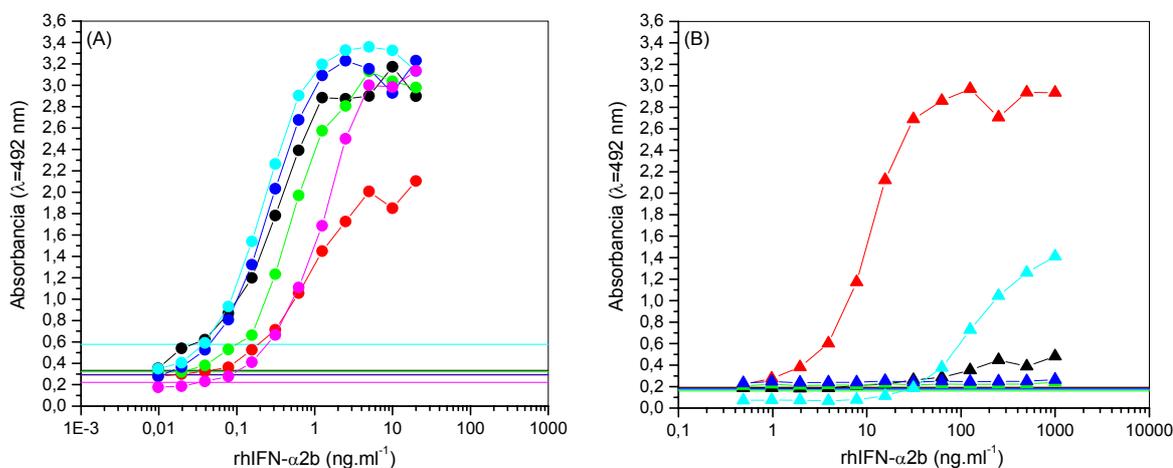


Fig. 15. ELISA *sandwich* para la cuantificación del rhIFN- α 2b no glicosilado.

Se representó la respuesta del ensayo, medida como la absorbancia a $\lambda=492$ nm, en el eje de ordenadas, en función de la concentración de rhIFN- α 2b, en el eje de abscisas. El ensayo se llevó a cabo utilizando los 11 mAbs del panel como anticuerpos de captura: (A) CA1A3 (●), CA2G7 (●), CA5E6 (●), CB15D7 (●), CB27H2 (●), CB29D3 (●), para un rango de concentraciones entre 0,0098 ng.ml⁻¹ y 20 ng.ml⁻¹ y (B) CA8B7 (▲), CA9C3 (▲), CB13A7 (▲), CB24D5 (▲), CB33B3 (▲), para un rango de concentraciones entre 0,488 ng.ml⁻¹ y 1.000 ng.ml⁻¹. Las líneas horizontales corresponden a los valores de los controles negativos obtenidos para cada mAb.

La mayoría de los mAbs (con excepción de CA8B7, CB13A7 y CB24D5) demostraron capacidad de reconocimiento de la citoquina soluble, exhibiendo diferentes grados de captación de la misma (evaluado mediante el límite de detección y sensibilidad del ensayo). Por otro lado,

no se observó respuesta cuando no se adsorbieron mAbs a la fase sólida, indicando que la citoquina no se une en forma inespecífica a la proteína de bloqueo.

Trabajos previos en nuestro laboratorio identificaron diferentes áreas moleculares del rhIFN- α 2b no glicosilado mapeadas por el panel de mAbs (Casalis, 2004). Como se mencionó anteriormente, es de especial interés en este trabajo contar con diferentes anticuerpos que, exhibiendo parámetros adecuados en el ensayo de ELISA, interaccionen con distintas áreas de la citoquina. En la Tabla V se observan algunos parámetros analíticos calculados con el fin de seleccionar anticuerpos que reúnan dichas características. El único mAb perteneciente al área I (CA1A3) mostró parámetros aceptables para la cuantificación del rhIFN- α 2b no glicosilado. De los anticuerpos agrupados dentro del área IIA, el mAb CB15D7 presentó el menor límite de detección y la mayor sensibilidad. Tanto el mAb CA5E6 como CB27H2 (área IIB) exhibieron parámetros adecuados en el ensayo, por lo que cualquiera de ellos podría utilizarse para dosar la concentración de la citoquina. Una desventaja del uso del mAb CB27H2 es que el control en ausencia de antígeno presentó un valor de absorbancia alto, indicando la presencia de alguna interacción inespecífica, lo que resulta en un aumento del límite de detección. Ningún mAb del área III fue capaz de captar al rhIFN- α 2b, obteniéndose una respuesta nula en el ensayo. Por último, si bien el mAb CA9C3 (área IV) demostró un límite de detección mayor que para el resto de los anticuerpos seleccionados, se consideró apropiado tenerlo en cuenta para la evaluación de las variantes del rhIFN- α 2b a través de la unión a un epítopo o una región molecular diferente.

Tabla V. Parámetros analíticos para evaluar la *performance* de los mAbs en el ELISA *sandwich*.

Área del rhIFN- α 2b mapeada	mAb	Límite de detección (ng.ml ⁻¹)	Sensibilidad (ml.ng ⁻¹)	Rango lineal (ng.ml ⁻¹)
I	CA1A3	0,03	1,98	0,16 - 1,25
	CB15D7	0,05	2,25	0,08 - 0,63
IIA	CB29D3	0,09	2,01	0,31 - 5,00
	CB33B3	31,04	1,11	62,50 - 250,00
IIB	CA2G7	0,06	1,08	0,31 - 5,00
	CA5E6	0,05	2,15	0,16 - 1,25
	CB27H2	0,08	2,21	0,08 - 0,63
III	CA8B7*	-	-	-
	CB24D5*	-	-	-
IV	CA9C3	0,71	2,40	3,91 - 31,25
	CB13A7*	-	-	-

*No exhibieron capacidad de reconocimiento de la citoquina soluble.

En conclusión, se seleccionaron 4 mAbs que reconocen áreas moleculares distintas de la citoquina no glicosilada desde un punto de vista inmunoquímico: CA1A3, CB15D7, CA5E6 y CA9C3. Estos anticuerpos presentan, además, diferentes límites de detección en el ensayo de ELISA, los cuales se encuentran relacionados con sus respectivas constantes de afinidad hacia la citoquina no glicosilada. El mAb CA1A3, cuya constante de afinidad es del orden de 10^{10} M^{-1} , presentó la mayor detectabilidad en el ensayo, mientras que los mAbs CB15D7 y CA5E6, que poseen una constante de afinidad del orden de 10^8 M^{-1} ($5,2 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ y $2,2 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$,

respectivamente), exhibieron un límite de detección levemente mayor. La disminución de la detectabilidad del sistema *sandwich* fue más notable cuando se utilizó el mAb CA9C3, cuya constante de afinidad por el rhIFN- α 2b es relativamente baja ($4,1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$), promoviendo una mayor disociación del complejo antígeno-anticuerpo. Sin embargo, este comportamiento no puede ser generalizado, ya que se encuentra influenciado por las características fisicoquímicas de la región variable de los anticuerpos de captura. Por ejemplo, la presencia de secuencias hidrofóbicas en la región Fab del mAb promueve su adsorción a la superficie plástica, disminuyendo su capacidad de interacción con el antígeno, aún cuando su afinidad por el mismo sea elevada.

1.1.1.2. ANÁLISIS DE DIFERENTES ENTORNOS PROTEICOS (EFECTO MATRIZ)

Un problema común que se presenta en los inmunoensayos es la influencia que ejercen los componentes de la solución en donde se encuentra la molécula a cuantificar sobre el reconocimiento inmunoquímico, fenómeno que se conoce como efecto matriz. Cuanto mayor sea el grado de complejidad de la matriz, como es el caso de los fluidos biológicos como suero, orina, etc., mayor es la probabilidad de que exista un efecto de esta índole. El mismo puede ser causado por interacciones de naturaleza inespecífica entre los componentes del medio (proteínas, lípidos y compuestos químicos, entre otros) y el analito (Selby, 1999). Este efecto puede conducir a una cuantificación incorrecta de la citoquina si ésta se encuentra en un medio de dilución diferente al del estándar.

Con el fin de evaluar dicho efecto sobre la determinación de la concentración del rhIFN- α 2b no glicosilado en diferentes entornos, se llevó a cabo un ELISA *sandwich* empleando los cuatro mAbs seleccionados previamente (sección 1.1.1.1). Se realizaron sucesivas diluciones 1:2 del rhIFN- α 2b en diferentes medios diluyentes desde $50 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ hasta $0,488 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$, para los mAbs CA1A3, CA5E6 y CB15D7, y desde $1.000 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ hasta $0,98 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$, para el mAb CA9C3. Los medios diluyentes se seleccionaron teniendo en cuenta los posibles entornos en los que se podría encontrar la citoquina durante el desarrollo del proceso, utilizando además medios de dilución frecuentemente empleados para este tipo de técnicas. En la Fig. 16 se observan los resultados obtenidos para todos los mAbs ensayados.

Para analizar la influencia de los diferentes medios de dilución, se calculó el porcentaje de recuperación de la concentración de la citoquina en cada uno de ellos, utilizando como estándar la curva de la citoquina diluida en solución de BSA 0,1% (P/V) en PBS - Tween 20 0,05% (V/V). La concentración del rhIFN- α 2b se determinó interpolando en las distintas curvas con un valor de absorbancia constante correspondiente al 50% de la zona de linealidad de la curva estándar. El cociente entre la concentración de rhIFN- α 2b del estándar y la dilución correspondiente a cada preparación para la mencionada absorbancia permitió determinar la concentración de la proteína. Posteriormente, se calculó la recuperación según la ecuación 48, donde C_D es la concentración de rhIFN- α 2b obtenida luego de la interpolación en las curvas correspondientes a los diferentes diluyentes y C_R , la concentración de rhIFN- α 2b real agregada a cada medio.

$$R (\%) = \frac{C_D}{C_R} \times 100 \quad (48)$$

En la Fig. 16 se observa que, para los mAbs CA1A3 y CA5E6, no se encontraron diferencias en la recuperación en los diferentes medios diluyentes. El promedio de las

recuperaciones en el punto medio de la curva del estándar para todos los medios de dilución empleados fue del $93,7 \pm 2,6\%$ para el mAb CA1A3 y del $88,8 \pm 2,1\%$ para el mAb CA5E6 (promedio \pm error estándar de la media, SEM, $n=7$). Teniendo en cuenta el coeficiente de variación intra-ensayo calculado para este esquema de ELISA (sección 1.1.3), este resultado indicaría que la interacción del rhIFN- α 2b con ambos anticuerpos no se encuentra afectada por las características de la matriz.

Para el mAb CB15D7, el promedio de las recuperaciones en los distintos medios fue del $82,7 \pm 4,6\%$, lo que también demuestra una baja dependencia de la cuantificación de la citoquina con el entorno. Sin embargo, cuando se utilizaron medios de cultivo o sobrenadantes condicionados por el crecimiento celular, los porcentajes de recuperación fueron menores.

Un comportamiento similar pero más acentuado se observa con el mAb CA9C3, para el cual la recuperación promedio en todos los medios diluyentes fue del $78,7 \pm 8,4\%$. No obstante, para los medios de cultivo basales suplementados con SFB se obtuvieron recuperaciones de aproximadamente un 50%, resultando en una subvaloración de la concentración de la citoquina adicionada a dicha matriz. Debido a que este efecto no mostró dependencia con el contenido de suero del medio de cultivo y no se visualizó utilizando SFB 5% (V/V) en PBS-Tween 20 0,05% (V/V) como diluyente, es probable que se produzca debido a la presencia de componentes inherentes únicamente a la formulación del medio de cultivo basal. Por otro lado, el hecho de que las recuperaciones en los medios condicionados por el crecimiento celular sean similares o mayores que en los medios basales indica que los factores liberados al sobrenadante por el metabolismo celular no tendrían efecto sobre el reconocimiento del antígeno.

En consecuencia, los mAbs CA1A3 y CA5E6 pueden ser utilizados para la cuantificación del rhIFN- α 2b presente en diferentes entornos, mientras que se debería tener especial cuidado al cuantificar la citoquina presente en medios y sobrenadantes de cultivo con los mAbs CB15D7 y CA9C3. Una forma de superar este inconveniente es realizar diluciones de la muestra original en el mismo diluyente en el que se encuentra el estándar, ya que se ha observado que la unificación del medio de dilución permite que la curva de la muestra se ajuste al comportamiento de la curva estándar, constituyendo además una ventaja operativa (Oggero, 2002; Amadeo, 2003).

Este comportamiento diferencial entre los mAbs destaca las diferencias que presentan en su interacción con el antígeno, relacionadas con las características del epítopo que reconocen y con el tipo de interacciones moleculares que se establecen durante la formación del complejo.

Otro parámetro fundamental a considerar en este tipo de ensayos es el paralelismo de las curvas dosis-respuesta. Idealmente, las curvas del estándar y analito deberían ser paralelas. El análisis de este factor tiene implicancias funcionales, ya que permite distinguir diferencias en la capacidad de reconocimiento del estándar y el analito por parte del anticuerpo, e implicancias prácticas, ya que permite determinar la concentración del analito en una muestra mediante la interpolación en cualquier sector de la zona lineal de la curva del estándar. Como se observa en la Fig. 16, los diferentes medios de dilución no afectaron el paralelismo ni el valor de saturación de las curvas para ninguno de los mAbs.

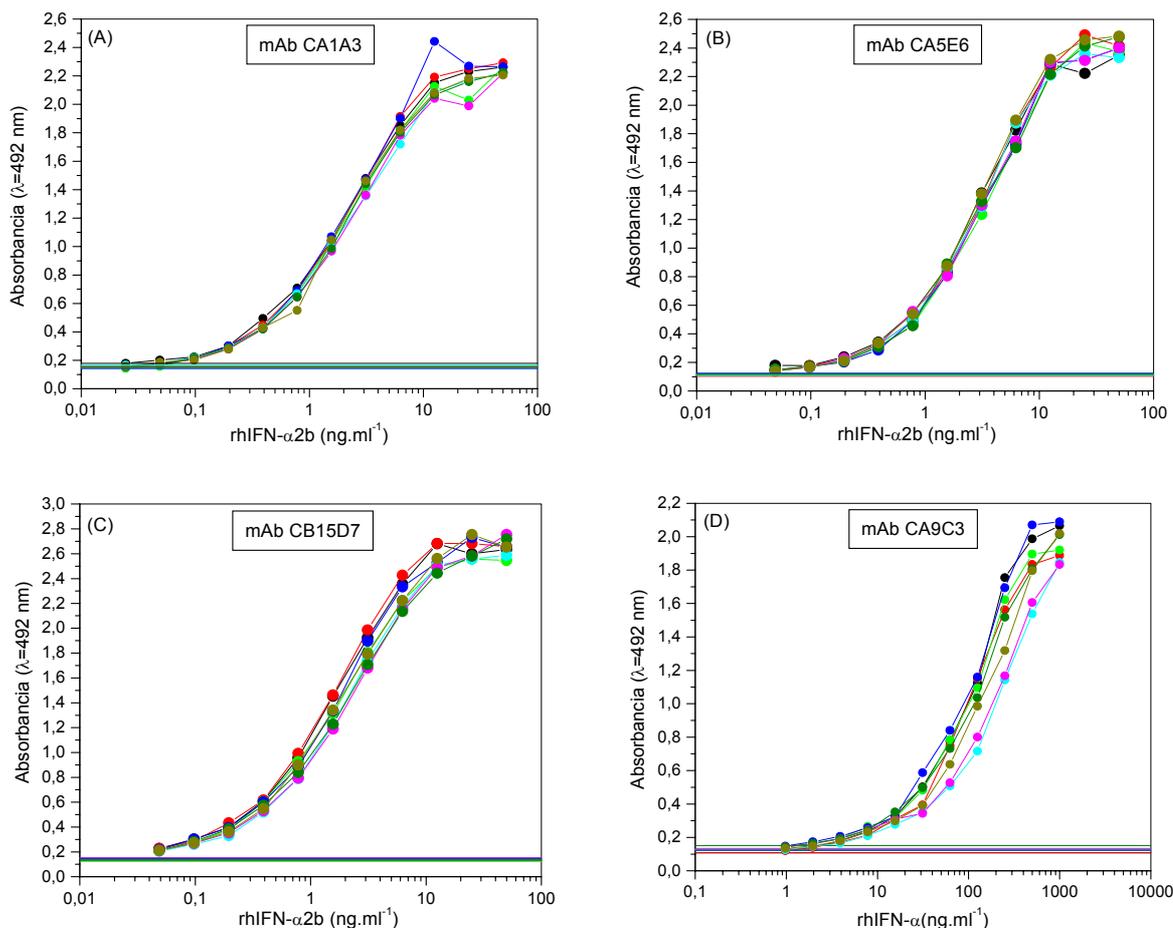


Fig. 16. Evaluación de la influencia del medio de dilución en la cuantificación del rhIFN- α 2b mediante técnica de ELISA *sandwich*.

Las curvas se realizaron utilizando rhIFN- α 2b no glicosilado desde una concentración inicial de 50 ng.ml⁻¹ para los mAbs CA1A3 (A), CA5E6 (B) y CB15D7 (C), y desde una concentración inicial de 1.000 ng.ml⁻¹ para el mAb CA9C3 (D). Los diluyentes empleados fueron: BSA 0,1% (P/V) en PBS-Tween 20 0,05% (V/V) (●), BSA 5% (P/V) en PBS-Tween 20 0,05% (V/V) (●), SFB 5% (V/V) en PBS-Tween 20 0,05% (V/V) (●), PBS (●), medio de cultivo A suplementado con SFB 0,1% (V/V) (●) o 5% (V/V) (●) y medio de cultivo A condicionado por el crecimiento de células CHO.K1 (●) o BHK-21 (●). Las líneas horizontales representan los valores de los controles negativos para cada diluyente.

1.1.2. ELISA DE COMPETICIÓN

Este ensayo consistió en la competición entre un Ag inmobilizado en fase sólida con el mismo Ag en fase líquida por su unión a un mAb en solución. La interacción remanente en fase sólida se midió agregando un segundo anticuerpo anti-especie murina conjugado con una enzima que, posteriormente, catalizó la transformación de su sustrato incoloro en una sustancia coloreada.

1.1.2.1. SELECCIÓN DE MABS DE COMPETICIÓN

Con el mismo propósito que para el ensayo de ELISA *sandwich*, se evaluaron individualmente todos los mAbs del panel como anticuerpos competidores, empleando como Ag el rhIFN- α 2b no glicosilado tanto en la fase sólida como en solución. Para realizar la competición, se utilizó la dilución de cada mAb que proporcionó una señal colorimétrica correspondiente al 50% de la máxima absorbancia en un ensayo de titulación, el cual se llevó a cabo mediante técnica de ELISA específico indirecto. La concentración de antígeno inmovilizado en el ensayo de titulación fue determinada previamente en el laboratorio y se usó posteriormente para el ELISA de competición (50 ng por pozo). En la Fig. 17 se muestran las curvas dosis-respuesta obtenidas para cada uno de los mAbs, utilizando un rango de concentraciones de rhIFN- α 2b soluble desde 10.000 ng.ml⁻¹ hasta 4,88 ng.ml⁻¹. Para cada uno de los mAbs competidores, se realizó una única curva y seis reiteraciones de su correspondiente control del 100% de unión del anticuerpo al antígeno inmovilizado en ausencia de competidor. Se calcularon parámetros analíticos con el fin de seleccionar aquellos mAbs con superior capacidad de cuantificación de la citoquina (Tabla VI).

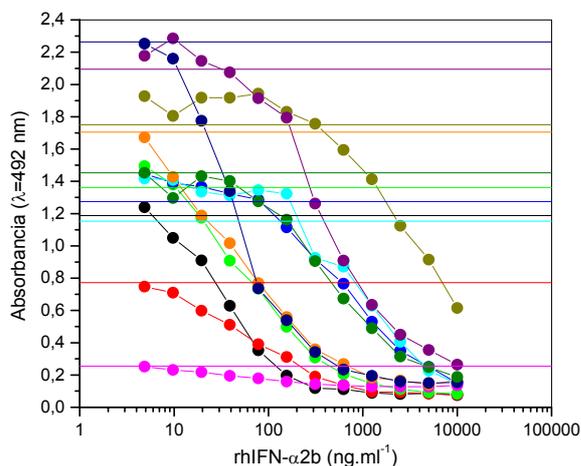


Fig. 17. ELISA de competición para la cuantificación del rhIFN- α 2b no glicosilado.

Se representó la respuesta del ensayo, medida como la absorbancia a $\lambda=492$ nm, en el eje de ordenadas, en función de la concentración del rhIFN- α 2b en solución, en el eje de abscisas. El ensayo se llevó a cabo utilizando los 11 mAbs del panel como anticuerpos competidores: CA1A3 (●), CA2G7 (●), CA5E6 (●), CA8B7 (●), CA9C3 (●), CB13A7 (●), CB15D7 (●), CB24D5 (●), CB27H2 (●), CB29D3 (●) y CB33B3 (●), para un rango de concentraciones entre 4,88 ng.ml⁻¹ y 10.000 ng.ml⁻¹.

Las líneas horizontales corresponden a los valores de los controles del 100% de unión de cada mAb al antígeno inmovilizado, en ausencia de antígeno soluble.

Los mAbs CA2G7 y CB13A7 exhibieron muy baja sensibilidad (0,34 ml.ng⁻¹ y 0,06 ml.ng⁻¹, respectivamente), por lo que no se consideraron apropiados para el desarrollo del ensayo. De acuerdo con el mAb utilizado, el límite de detección osciló entre 4,60 ng.ml⁻¹ y 319,20 ng.ml⁻¹, obteniéndose una mayor detectabilidad con los anticuerpos CA1A3, CA5E6, CB15D7 y CB27H2. Estos anticuerpos presentaron, además, una sensibilidad aceptable, por lo que fueron seleccionados como posibles candidatos para la cuantificación de las diferentes variantes del rhIFN- α 2b. Además, los tres primeros mAbs mencionados mapean diferentes áreas de la citoquina, lo que resulta de gran utilidad a los fines de contar con un ensayo con potencial

capacidad para reconocer las muteínas glicosiladas. Si bien el mAb CB27H2 compite con el mAb CA5E6 por el reconocimiento del rhIFN- α 2b, ambos se tuvieron en cuenta para su eventual uso en la evaluación de las diferentes variantes de la proteína.

Tabla VI. Parámetros analíticos para evaluar la *performance* de los mAbs en el ELISA de competición.

Área del rhIFN- α 2b mapeada	mAb	Límite de detección (ng.ml ⁻¹)	Sensibilidad (ml.ng ⁻¹)	Rango lineal (ng.ml ⁻¹)		
I	CA1A3	5,90	0,79	10	-	78
	CB15D7	4,60	0,72	5	-	625
IIA	CB29D3	32,10	1,27	156	-	1.250
	CB33B3	65,30	0,75	156	-	1.250
IIB	CA2G7	4,90	0,34	10	-	313
	CA5E6	10,20	0,72	10	-	312
	CB27H2	4,70	1,56	10	-	78
III	CA8B7	83,00	0,63	78	-	5.000
	CB24D5	319,20	0,82	625	-	10.000
IV	CA9C3	209,70	0,72	156	-	5.000
	CB13A7	7,90	0,06	10	-	156

El comportamiento de los mAbs en ambos tipos de ELISA fue dispar, ya que algunos mAbs cuya reacción fue nula en el ensayo *sandwich*, presentaron una respuesta buena o moderada en el ensayo de competición (CA8B7, CB24D5), mientras que el mAb CB13A7 no fue capaz de generar una curva dosis-respuesta en ninguno de los ensayos. Estas diferencias pueden atribuirse a que la conducta de los anticuerpos es variable según se encuentren inmovilizados en la fase sólida (ELISA *sandwich*) o presentes en la fase soluble (ELISA de competición). La adsorción de los mAbs al plástico podría alterar la capacidad de reconocimiento del antígeno. Por ejemplo, la existencia de regiones hidrofóbicas en la región Fab favorece la interacción con el material plástico de la placa de microtitulación, disminuyendo la densidad de sitios potenciales para la unión del antígeno. Recíprocamente, en el ensayo competitivo, el antígeno podría inmovilizarse preferentemente mediante determinadas áreas de la molécula, ocultando epitopes reconocidos por ciertos mAbs.

La configuración del ensayo de ELISA *sandwich* provee la ventaja de un doble reconocimiento del analito, lo cual aumenta mucho su especificidad. No obstante, la condición de requerir anticuerpos que reconozcan epitopes distanciados espacialmente puede resultar en una desventaja si muchos de dichos epitopes se encuentran enmascarados por la presencia de oligosacáridos.

La detectabilidad del ELISA *sandwich* fue mayor que la correspondiente al ensayo de competición para la mayoría de los mAbs, obteniéndose un adecuado límite de detección con respecto a las concentraciones que normalmente se alcanzan en los sobrenadantes de cultivo de células de mamífero productoras de proteínas recombinantes. Este resultado concuerda con datos bibliográficos que indican que los ensayos no competitivos poseen, en general, un límite de detección de aproximadamente dos órdenes de magnitud mayor que los ensayos competitivos para anticuerpos de la misma afinidad (Ekins, 1989; Ehrman y col., 1989). Por este motivo, el

ELISA *sandwich* se seleccionó como método para cuantificar la citoquina en matrices complejas, donde generalmente se encuentra diluida por la presencia de otras proteínas.

1.1.3. VALIDACIÓN DE LOS INMUNOENSAYOS Y EVALUACIÓN DE LA REPRODUCIBILIDAD INTRA- E INTER-ENSAYO

La expresión transitoria de las muteínas glicosiladas del rhIFN- α 2b en células de mamífero (sección 5.2) permitió seleccionar al mAb CA5E6 como anticuerpo de captura en el ensayo de ELISA *sandwich* y como anticuerpo competidor en el ensayo de ELISA de competición para la cuantificación de cualquier variante de la citoquina con un único sitio de *N*-glicosilación.

La Fig. 18 muestra la estimación de la concentración de dos variantes del rhIFN- α 2b con un sitio de *N*-glicosilación (rhIFN- α 2bR23N y rhIFN- α 2bD77N) presentes en sobrenadantes de cultivo de células CHO transfectadas en forma transitoria con los correspondientes plásmidos de expresión, mediante técnica de ELISA *sandwich* (Fig. 18A) y de ELISA de competición (Fig. 18B). La determinación fue realizada utilizando el ensayo de rectas paralelas, basado en la comparación de la respuesta de una muestra con la de un estándar de referencia. Todas las curvas se realizaron por triplicado, utilizándose como estándar rhIFN- α 2b no glicosilado.

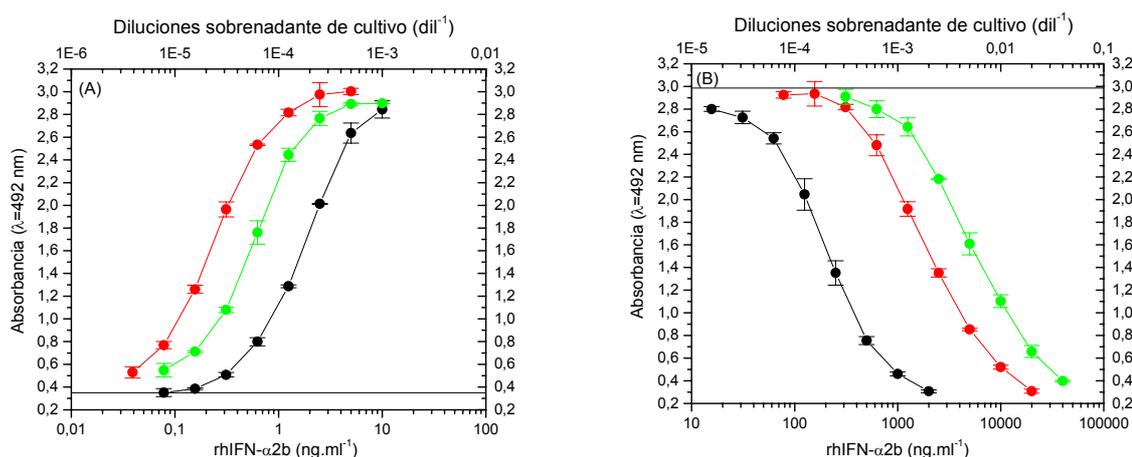


Fig. 18. Estimación de la concentración de dos variantes del rhIFN- α 2b con un sitio de *N*-glicosilación mediante técnica de ELISA *sandwich* (A) y de competición (B).

La cuantificación de las variantes glicosiladas rhIFN- α 2bR23N (●) y rhIFN- α 2bD77N (●) presentes en sobrenadantes de cultivo fue realizada frente a un estándar de rhIFN- α 2b no glicosilado (●). Las curvas correspondientes al estándar y las muestras fueron procesadas por triplicado y los resultados se muestran como el valor promedio \pm SD. Las líneas horizontales indican el valor promedio del control negativo (A) o del control del 100% de unión (B), ambos procesados por triplicado.

La validación del ensayo se llevó a cabo mediante el análisis estadístico de la varianza (ANOVA), el cual permite evaluar los parámetros de regresión, linealidad y paralelismo de las curvas correspondientes al estándar y a la muestra (Milano, 2001).

En primer lugar, se realizó la prueba de Bartlett con el fin de establecer la existencia de homocedasticidad u homogeneidad de varianzas, condición fundamental para la aplicación del ANOVA.

Posteriormente, se evaluaron todos los componentes de la varianza, comparando el valor de F (prueba estadística de Fisher) obtenido para cada uno de ellos frente al valor F de tabla correspondiente a una confianza del 99%. En todos los casos, el valor de F calculado tanto para el paralelismo como para la linealidad resultó inferior al valor de tabla, cumpliéndose de este modo ambas condiciones. El valor F para las regresiones fue significativamente elevado comparado con el correspondiente valor de tabla, confirmando la existencia de una regresión y permitiendo calcular límites de confianza de la concentración de la muestra lo suficientemente estrechos como para demostrar la utilidad del ensayo. Para el análisis de la varianza y la estimación de la concentración se emplearon 3 puntos de cada curva confirmados dentro de una zona de regresión lineal con un valor de correlación superior a 0,99.

El valor promedio de una serie de mediciones no brinda toda la información que los datos proporcionan, sino que carece de una parte esencial que indica el grado de dispersión en torno a ese valor central. Entre los factores que afectan la exactitud de una medición se encuentran el uso de un estándar precalibrado como estándar interno, el paralelismo de las curvas dosis-respuesta del estándar y la muestra y otros parámetros relacionados con los errores sistemáticos y aleatorios responsables de una baja reproducibilidad o imprecisión de los ensayos (Lison, 1976).

La puesta a punto de un ensayo de cuantificación requiere necesariamente de la estimación de la precisión o reproducibilidad del ensayo. La evaluación de estos parámetros estadísticos demanda el análisis de mediciones reiteradas de diferentes muestras del analito, dentro del mismo ensayo o en ensayos reproducidos en diferentes ocasiones, para luego calcular los coeficientes de variación (CV) intra-ensayo o inter-ensayo, respectivamente. Con este fin, se procedió a medir la concentración de las dos variantes con un sitio de *N*-glicosilación (rhIFN- α 2bR23N y rhIFN- α 2bD77N) presentes en sobrenadantes de cultivo mediante técnica de ELISA *sandwich* y de ELISA de competición. Se utilizó como estándar rhIFN- α 2b no glicosilado en concentraciones variables desde 10 ng.ml⁻¹ hasta 0,78 ng.ml⁻¹ para el primer caso, y desde 2.000 ng.ml⁻¹ hasta 15,63 ng.ml⁻¹ para el segundo. Las muestras se procesaron por triplicado dentro de cada ensayo, reiterándose en tres ocasiones diferentes. El CV intra e inter-ensayo se calculó utilizando la ecuación 49, donde CV representa el coeficiente de variación, SD, la desviación estándar resultante de la determinación de la concentración de las muteínas evaluadas por triplicado y P, el promedio de las mencionadas determinaciones. En el caso de determinar el CV intra-ensayo, SD y P representaron la desviación estándar y el promedio de la cuantificación realizada por triplicado dentro del mismo ensayo. Cuando se evaluó el CV inter-ensayo, SD y P representaron la desviación estándar y el promedio de las concentraciones calculadas a partir de las determinaciones realizadas en tres ocasiones diferentes.

$$CV (\%) = \frac{SD}{P} \times 100 \quad (49)$$

En la Tabla VII se resumen los CV intra e inter-ensayo empleando el procedimiento de ELISA *sandwich* para la cuantificación de las dos variantes *N*-glicosiladas de rhIFN- α 2b y en la Tabla VIII se muestran los mismos datos para el ensayo de ELISA de competición. Los valores de los CV intra-ensayo oscilaron entre un 1,6 y 9,3% para el ELISA *sandwich* y un 0,1 y 7,9% para el ELISA de competición, con un CV promedio de 5,1 \pm 1,1% y 3,7 \pm 1,2% (promedio de los coeficientes \pm SEM, n=6), respectivamente. Las determinaciones inter-ensayo demostraron un CV promedio de 12,2 \pm 4,4% para el ensayo *sandwich* y de 12,3 \pm 0,2% para la técnica de competición (promedio de los coeficientes \pm SEM, n=2). Se observa que la reproducibilidad intra

e inter-ensayo es similar para ambos tipos de ELISA, no detectándose tampoco diferencias importantes en los valores de los CV obtenidos para cada una de las muestras. Asimismo, estos valores de CV son comparables a los publicados para otros ensayos de ELISA utilizados para la cuantificación de citoquinas, entre los que se pueden mencionar un ELISA *sandwich* para dosar rhEPO (Amadeo, 2003) y un ELISA de competición para cuantificar GM-CSF (Oggero, 2002).

Tabla VII. Reproducibilidad intra e inter-ensayo del procedimiento de ELISA *sandwich* para la cuantificación del rhIFN- α 2b.

Muestra	Reproducibilidad			
	Intra-ensayo CV (%)		Inter-ensayo CV (%)	
rhIFN- α 2bR23N	5,8	8,4	1,6	16,6
rhIFN- α 2bD77N	9,3	1,6	3,9	7,8

Tabla VIII. Reproducibilidad intra e inter-ensayo del procedimiento de ELISA de competición para la cuantificación del rhIFN- α 2b.

Muestra	Reproducibilidad			
	Intra-ensayo CV (%)		Inter-ensayo CV (%)	
rhIFN- α 2bR23N	0,1	1,2	7,9	12,1
rhIFN- α 2bD77N	7,2	0,8	5,2	12,5

1.2. CROMATOGRAFÍA EN FASE REVERSA

Los métodos cromatográficos probablemente son, en conjunto, las técnicas fisicoquímicas que mayor información proveen en el análisis de citoquinas, ya que son capaces de resolver la mayoría de las especies proteicas presentes en una muestra, permitiendo su caracterización detallada en asociación con otras metodologías (Mire-Sluis, 1999). En condiciones óptimas, la cromatografía en fase reversa (*reversed-phase chromatography*, RPC) trabaja en el orden de microgramos y es capaz de detectar impurezas presentes en porcentajes de hasta 0,1%. Debido a su excelente poder resolutivo, la RPC se ha convertido en la técnica de HPLC más utilizada para el análisis de proteínas y péptidos (Esser y Unger, 2000).

Con el objeto de disponer de una metodología fisicoquímica para la cuantificación del rhIFN- α 2b en la que no influyan las interacciones inmunoquímicas y, simultáneamente, evaluar el grado de pureza de muestras de la citoquina purificada, se llevó a cabo una RPC en un equipo de HPLC, empleando una columna C4.

En primer lugar, se construyó por duplicado una curva de calibración, utilizando como estándar rhIFN- α 2b no glicosilado en un rango de concentraciones entre 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y 80 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. La Fig. 19 muestra la respuesta obtenida (medida como el área bajo la curva de absorbancia a una $\lambda=210$ nm en función del tiempo) versus la concentración de rhIFN- α 2b en la muestra inyectada. El rango de linealidad estuvo comprendido entre 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y 40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, con un coeficiente de correlación superior a 0,99. Para esta técnica, se definió como límite de detección la concentración del analito que genera una relación señal/ruido igual a 2. La señal se define como la altura del pico y el ruido es la amplitud de las oscilaciones de la línea de base (Lough y Wainer, 1996) (Fig. 20A). En este caso, se obtuvo un límite de detección de 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

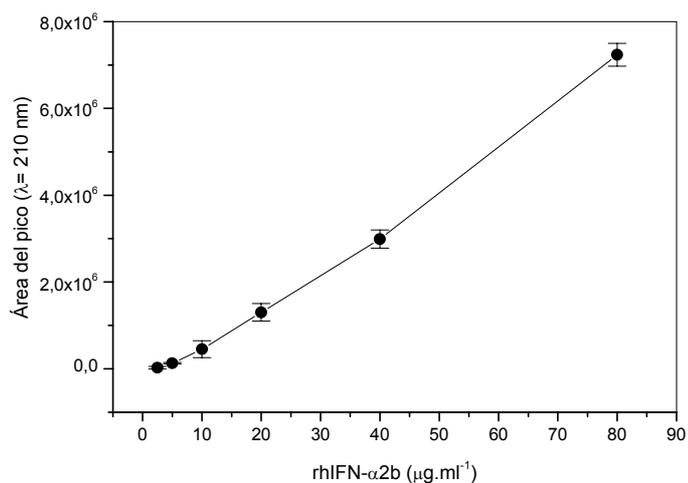


Fig. 19. RP-HPLC cuantitativo.

Se representó la respuesta analítica, medida como el área bajo la curva de absorbancia a $\lambda=210$ nm en función del tiempo, en el eje de ordenadas, en función de la concentración de rhIFN- α 2b, en el eje de abscisas. La curva se procesó por duplicado.

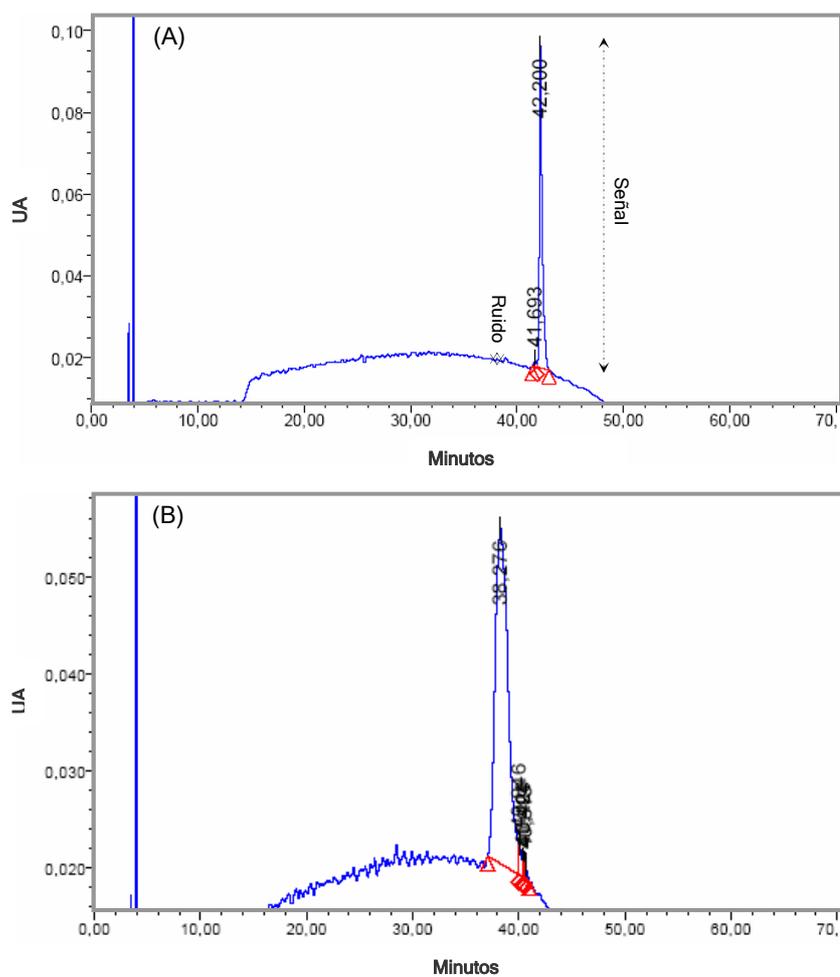


Fig. 20. Cuantificación del rhIFN- α 2b mediante RP-HPLC.

Los cromatogramas obtenidos para el rhIFN- α 2b no glicosilado ($20 \mu\text{g.ml}^{-1}$) (A) y para una muteína del rhIFN- α 2b con cuatro sitios de *N*-glicosilación (B) representan la respuesta obtenida a $\lambda=210$ nm (en unidades arbitrarias, UA) en función del tiempo de retención (en minutos). Se evaluó por triplicado una única dilución de la muestra. La curva del estándar se procesó por duplicado.

La Fig. 20 muestra un cromatograma obtenido para el rhIFN- α 2b no glicosilado en una concentración de 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (A) y para una muestra de una variante de rhIFN- α 2b con cuatro sitios de *N*-glicosilación (B). Se observa que los tiempos de retención varían según la identidad de la molécula. Para evaluar la reproducibilidad de la técnica, dicha muestra fue cuantificada por triplicado dentro de un mismo ensayo, reiterándose en dos ocasiones diferentes. Los CV intra e inter-ensayo se calcularon utilizando la ecuación 49 (sección 1.1.3). El valor promedio del CV intra-ensayo fue del $3,4 \pm 0,9\%$ (valor promedio de los coeficientes \pm SEM, $n=2$), mientras que el CV inter-ensayo fue del 2,8%, ambos valores apropiados para este tipo de metodología, e inferiores a los CV obtenidos mediante el empleo de ensayos inmunoquímicos para la cuantificación de la citoquina.

2. DESARROLLO DE ENSAYOS DE VALORACIÓN BIOLÓGICA *IN VITRO* DEL rhIFN- α 2b

Los inmunoensayos constituyen uno de los métodos más empleados para la cuantificación de citoquinas. Sin embargo, estos ensayos no proveen información de la función biológica, ya que, en general, detectan tanto proteínas activas como inactivas. Mientras que sutiles cambios en la estructura molecular pueden no alterar la capacidad de unión a un anticuerpo, la actividad biológica de la citoquina puede verse seriamente afectada. Por el contrario, los bioensayos brindan una estimación de la capacidad de una proteína de inducir una respuesta biológica, datos que resultan de mayor relevancia para predecir la acción *in vivo* de las citoquinas (Mire-Sluis y col., 1995b; Mire-Sluis, 2001).

Los bioensayos pueden tomar diferentes formatos, siendo los más utilizados los ensayos *in vitro* que emplean líneas celulares capaces de responder a la acción de una determinada citoquina. No obstante, muchos productos biológicos poseen más de una acción biológica. Las citoquinas pueden actuar sobre una gran variedad de líneas celulares e inducir una gama de respuestas, que comprenden desde la proliferación y la diferenciación hasta la citotoxicidad.

Los dos ensayos más ampliamente utilizados para la medición de la actividad biológica del rhIFN- α 2b son los ensayos antivirales y los ensayos antiproliferativos. Si bien la elección de uno u otro puede basarse en el uso terapéutico requerido, los resultados obtenidos no reflejan necesariamente su eficacia clínica, la cual se encuentra influenciada por diversos factores como su biodisponibilidad y su vida media, entre otros.

2.1. ENSAYO DE VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA ANTIVIRAL DEL rhIFN- α 2b

El ensayo de valoración de la actividad biológica antiviral del rhIFN- α 2b y sus diferentes variantes glicosiladas se basó en la cuantificación del efecto protector de la citoquina sobre células susceptibles a la acción citopática producida por una infección viral (Familletti y col., 1981; Rubinstein y col., 1981).

2.1.1. OPTIMIZACIÓN DE UN ENSAYO DE VALORACIÓN BIOLÓGICA ANTIVIRAL

Para la optimización del bioensayo, se utilizó el par línea celular MDBK/virus de la estomatitis vesicular (VSV).

En primer lugar, se optimizó el tiempo de incubación de las células MDBK con el rhIFN- α 2b no glicosilado antes del agregado del virus. Teniendo en cuenta que, de acuerdo con

lo descrito por Rubinstein y col. (1981), el efecto protector del IFN aumenta progresivamente durante las primeras 6 h de incubación, se evaluaron cuatro condiciones: sin incubación, 2, 4 y 6 h de incubación (Fig. 21). La selección de la mejor condición de trabajo se basó en la determinación del límite de detección, la sensibilidad y el rango lineal de trabajo (Tabla IX). Cuando las células no se incubaron previamente con el rhIFN- α 2b antes de la infección viral, la sensibilidad y el límite de detección del ensayo fueron menores que en los restantes casos, indicando que es necesario que transcurra un tiempo mínimo para que se complete la inducción del estado antiviral. Si bien la sensibilidad del ensayo fue similar para los restantes tiempos de incubación, se obtuvo un menor límite de detección mediante una incubación de 6 h, por lo que se escogió esta condición para continuar con la optimización.

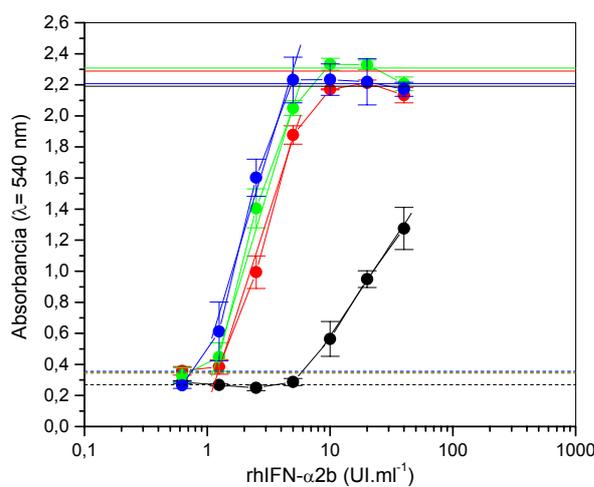


Fig. 21. Optimización del tiempo de incubación de las células MDBK con el rhIFN- α 2b antes de la infección viral en ensayos de valoración biológica antiviral *in vitro*.

Se graficó la respuesta del ensayo, medida como la absorbancia a $\lambda=540$ nm, en el eje de ordenadas, en función de la actividad biológica del rhIFN- α 2b, en el eje de abscisas. Las curvas se realizaron por triplicado, utilizando rhIFN- α 2b no glicosilado desde una actividad biológica inicial de 40 UI.ml⁻¹. Los resultados se muestran como el valor promedio \pm SD. Los tiempos de incubación evaluados fueron: 0 h (●), 2 h (●), 4 h (●) y 6 h (●). Las líneas horizontales completas representan los controles de crecimiento celular en ausencia de virus y de rhIFN- α 2b y las líneas horizontales punteadas representan los controles de lisis celular en ausencia de rhIFN- α 2b.

Tabla IX. Parámetros analíticos obtenidos para distintos tiempos de incubación de las células MDBK con el rhIFN- α 2b antes de la infección viral en ensayos de valoración biológica antiviral *in vitro*.

Tiempo de incubación (h)	Límite de detección (UI.ml ⁻¹)	Sensibilidad (ml.UI ⁻¹)	Rango lineal (UI.ml ⁻¹)
0	3,68	1,19	5,00 - 40,00
2	0,95	2,47	1,25 - 5,00
4	0,85	2,62	1,25 - 5,00
6	0,79	2,61	1,25 - 5,00

En segunda instancia, se evaluó la conveniencia de llevar a cabo el ensayo mediante el agregado simultáneo de la suspensión celular y el rhIFN- α 2b a la microplaca de cultivo tal como

se realizara el ensayo para optimizar los tiempos de incubación (ensayo A) o mediante la adición del rhIFN- α 2b a una monocapa pre-establecida, de manera de partir de una población celular más homogénea (ensayo B). Tanto la sensibilidad ($2,34 \text{ ml.Ul}^{-1}$) como el límite de detección ($0,63 \text{ Ul.ml}^{-1}$) del ensayo modificado (ensayo B) fueron similares a los obtenidos para el ensayo original (Tabla IX, 6 h de incubación). Debido a que la modificación introducida se realizó con el fin de minimizar la variabilidad del ensayo, la selección de la mejor condición de trabajo se basó en la determinación del CV intra e inter-ensayo. En la Tabla X se resumen los CV obtenidos para ambos ensayos de valoración biológica antiviral del rhIFN- α 2b. Los mismos se calcularon a partir de la valoración biológica de una muestra de la citoquina con un sitio de *N*-glicosilación (rhIFN- α D77N), que se realizó por triplicado dentro de un mismo ensayo y se reiteró en tres ocasiones diferentes. Los valores de los CV intra-ensayo fueron muy similares para los dos métodos, con un CV promedio de $2,27 \pm 1,25\%$ para el ensayo A y de $2,60 \pm 1,25\%$ para el ensayo B (promedio de los coeficientes \pm SEM, $n=3$). Este resultado es coherente, si se tiene en cuenta que, dentro de un mismo ensayo, ambos métodos utilizan la misma suspensión celular para toda la placa de cultivo. No obstante, se obtuvo una mayor reproducibilidad inter-ensayo para el ensayo B, lo que sugiere que para obtener repetitividad en ensayos independientes es conveniente medir la actividad antiviral del rhIFN- α 2b sobre una monocapa celular pre-establecida. Posiblemente, el cultivo previo de las células para establecer una monocapa permita alcanzar una superior homogeneidad de la densidad celular durante las distintas ocasiones en las que se lleva a cabo el ensayo. Dicha homogeneidad podría ser responsable de la mayor reproducibilidad observada en los ensayos de tipo B. Por este motivo, se adoptó como ensayo de valoración biológica antiviral del rhIFN- α 2b la metodología consistente en las siguientes etapas: preparación de una monocapa celular, incubación de la misma con el rhIFN- α 2b durante 6 h, agregado del virus VSV y revelado luego de 24 h.

Tabla X. Reproducibilidad intra e inter-ensayo en ensayos de valoración biológica antiviral *in vitro* del rhIFN- α 2b utilizando células MDBK.

Ensayo	Reproducibilidad			
	Intra-ensayo CV (%)		Inter-ensayo CV (%)	
A	1,1	1,6	4,1	20,3
B	1,3	5,1	1,4	3,6

Finalmente, se evaluó la sensibilidad de la línea celular WISH, de origen humano, a la acción protectora del rhIFN- α 2b frente a una infección con el virus VSV. En la Fig. 22 se muestra el ensayo de valoración biológica antiviral optimizado empleando ambas líneas celulares. Para cada ensayo se calcularon nuevamente los parámetros analíticos que se muestran en la Tabla XI. Como se puede observar, la línea celular WISH presenta una menor sensibilidad a la acción del rhIFN- α 2b, obteniéndose un límite de detección aproximadamente diez veces superior con respecto a la línea celular MDBK. En consecuencia, se seleccionó la línea celular bovina MDBK para la valoración biológica de la actividad antiviral *in vitro* del rhIFN- α 2b.

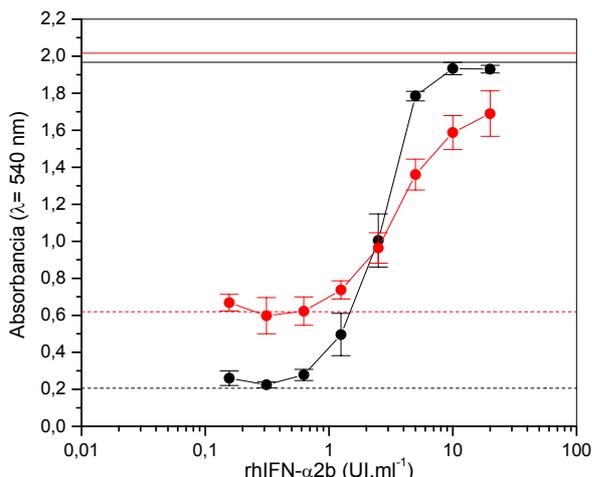


Fig. 22. Ensayo de valoración biológica antiviral *in vitro* del rhIFN-α2b empleando diferentes líneas celulares.

Comparación del efecto protector del rhIFN-α2b sobre células MDBK (●) y WISH (●) frente a una infección viral. Las curvas se realizaron por quintuplicado, utilizando rhIFN-α2b no glicosilado desde una actividad biológica inicial de 20 UI.ml⁻¹. Los resultados se muestran como el valor promedio ± SD. Las líneas completas representan los controles de crecimiento celular en ausencia de virus y de rhIFN-α2b y las líneas punteadas representan los controles de lisis celular en ausencia de rhIFN-α2b.

Tabla XI. Parámetros analíticos de ensayos de valoración de la actividad biológica antiviral *in vitro* del rhIFN-α2b empleando diferentes líneas celulares.

Línea celular	Límite de detección (UI.ml ⁻¹)	Sensibilidad (ml.UI ⁻¹)	Rango lineal (UI.ml ⁻¹)
MDBK	0,26	2,20	1,25 - 5,00
WISH	2,50	1,00	1,25 - 5,00

2.1.2. VALORACIÓN BIOLÓGICA ANTIVIRAL

A continuación se muestran ejemplos de estimación de la potencia biológica antiviral de una variante del rhIFN-α2b con un sitio de *N*-glicosilación (rhIFN-α2bD77N) y de otra variante de la citoquina con cuatro sitios de *N*-glicosilación (rhIFN-α2b4N) presentes en sobrenadantes de cultivo de líneas celulares CHO recombinantes (Fig. 23). La determinación fue realizada utilizando el ensayo de rectas paralelas. Las curvas se realizaron por quintuplicado, utilizándose el estándar internacional de la OMS para el rhIFN-α2b no glicosilado producido en *E.coli* (NIBSC 95/566).

La validación del ensayo se llevó a cabo mediante el análisis estadístico de la varianza o ANOVA mencionado anteriormente (sección 1.1.3). Para ambas muestras, el valor de F (prueba estadística de Fisher) calculado tanto para el paralelismo como para la linealidad resultó inferior con respecto al valor crítico F de tabla para una confianza del 99%, cumpliéndose de este modo ambas condiciones. El valor F para las regresiones fue significativamente elevado comparado con el correspondiente valor de tabla, confirmando la existencia de regresión. Las varianzas demostraron ser homogéneas, permitiendo establecer la validez del análisis realizado.

De esta manera, se puede concluir que el ensayo desarrollado es apropiado para la valoración de la actividad biológica antiviral de ambas variantes glicosiladas del rhIFN- α 2b.

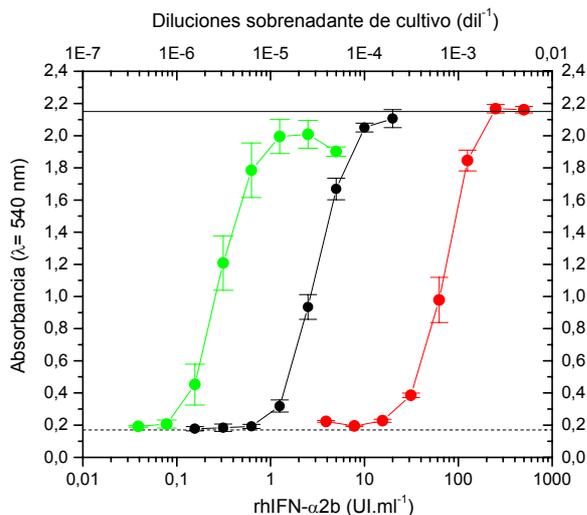


Fig. 23. Valoración de la actividad biológica antiviral *in vitro* de dos variantes *N*-glicosiladas del rhIFN- α 2b.

La valoración de la actividad biológica de la variante con un sitio de *N*-glicosilación rhIFN- α 2bD77N (●) y de la variante con cuatro sitios de *N*-glicosilación rhIFN- α 2b4N (●), presentes en sobrenadantes de cultivo de líneas CHO recombinantes, fue realizada frente al estándar internacional de la OMS para la citoquina no glicosilada (●). Las curvas correspondientes al estándar y a las muestras fueron procesadas por quintuplicado y los resultados se muestran como el valor promedio \pm SD. La línea horizontal completa indica el valor promedio de absorbancia del control de crecimiento celular, mientras que la línea horizontal punteada indica el valor promedio de absorbancia del control de lisis celular.

2.2. ENSAYO DE VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA ANTIPROLIFERATIVA DEL rhIFN- α 2b

Los ensayos de valoración biológica antiproliferativa *in vitro* del rhIFN- α 2b consisten en la cuantificación de los efectos que esta citoquina induce sobre la viabilidad y proliferación de una línea celular determinada. La actividad inhibitoria del crecimiento que poseen los IFNs es extremadamente dependiente del tipo celular. Los fibroblastos diploides normales son generalmente resistentes a los efectos antiproliferativos del IFN, mientras que las células precursoras hematopoyéticas, particularmente las de origen mieloide, son relativamente sensibles a su acción. Sin embargo, debido a que estos tipos celulares no son particularmente apropiados para ensayos antiproliferativos, se ha enfocado la atención hacia líneas celulares transformadas o derivadas de tumores. En general, el IFN- β es más eficiente en la inhibición del crecimiento de la mayoría de los tipos celulares, con excepción de la línea celular Daudi, derivada del linfoma de Burkitt, la cual es extremadamente sensible a la acción antiproliferativa del IFN- α (Adams y col., 1975; Borden y col., 1982). Por este motivo, la línea celular Daudi es la más utilizada para llevar a cabo ensayos de valoración de la actividad antiproliferativa del rhIFN- α 2b.

2.2.1. OPTIMIZACIÓN DE UN ENSAYO DE VALORACIÓN BIOLÓGICA ANTIPROLIFERATIVA

En la Fig. 24 se muestra la puesta a punto del ensayo de valoración biológica antiproliferativa *in vitro* del rhIFN- α 2b. Se evaluaron diferentes condiciones experimentales, en lo referente al inóculo inicial de células Daudi y la duración del período de incubación. Se optimizó, además, el rango de concentración de actividad del rhIFN- α 2b a emplear en el ensayo.

En la Tabla XII se resumen algunos parámetros analíticos obtenidos para cada una de las experiencias. La mejor condición de trabajo, seleccionada teniendo en cuenta la mayor sensibilidad del ensayo calculada en la zona de respuesta lineal del mismo, correspondió al empleo de 5.000 células como inóculo inicial durante 96 h de incubación.

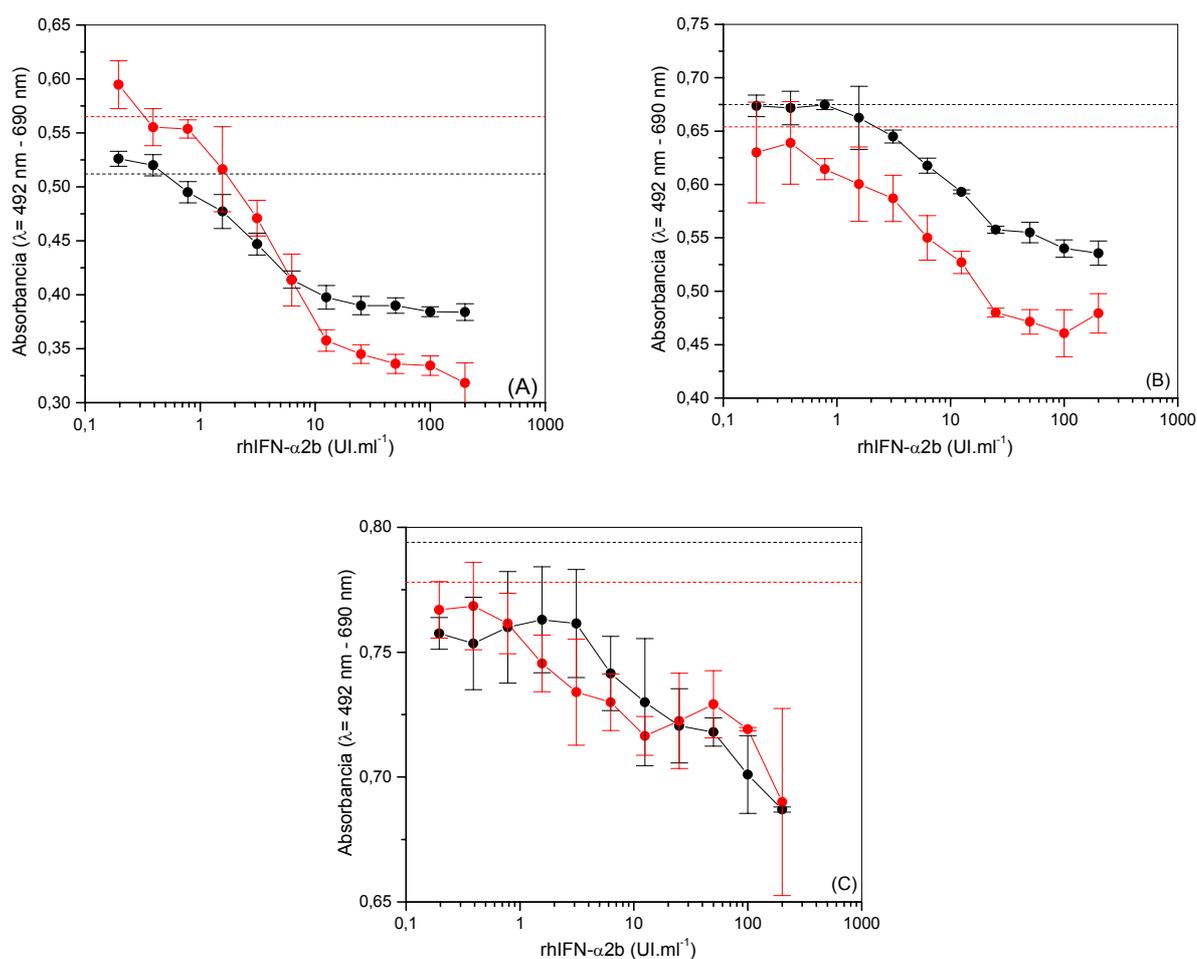


Fig. 24. Optimización del ensayo de valoración de la actividad biológica antiproliferativa *in vitro* del rhIFN- α 2b.

Se graficó la respuesta del ensayo, medida como la absorbancia a $\lambda=492$ nm menos la absorbancia a $\lambda=690$ nm, en el eje de ordenadas, en función de la actividad biológica del rhIFN- α 2b, en el eje de abscisas. Las curvas se realizaron por triplicado, utilizando rhIFN- α 2b no glicosilado desde una actividad biológica inicial de 200 UI.ml⁻¹, y los resultados se expresan como el valor promedio \pm SD. Las líneas horizontales punteadas indican el valor promedio del control de máxima proliferación celular en ausencia de rhIFN- α 2b. Se compararon tres inóculos celulares iniciales: (A) 5.000 células por pozo y (B) 10.000 células por pozo y (C) 15.000 células por pozo, y dos tiempos de incubación: 72 h (●) y 96 h (●).

Tabla XII. Parámetros analíticos de ensayos de valoración de la actividad biológica antiproliferativa *in vitro* del rhIFN- α 2b.

Inóculo inicial (Cél.)	Tiempo de incubación (h)	Sensibilidad (ml.UI ⁻¹)	Rango lineal (UI.ml ⁻¹)
5.000	72	0,09	0,78 - 12,50
	96	0,16	0,78 - 12,50
10.000	72	0,10	1,56 - 25,00
	96	0,12	0,78 - 12,50
15.000	72	0,03	3,13 - 25,00
	96	0,04	0,78 - 12,50

2.2.2. VALORACIÓN BIOLÓGICA ANTIPROLIFERATIVA

A partir del ensayo optimizado se muestran ejemplos de la estimación de la potencia biológica antiproliferativa de una variante del rhIFN- α 2b con un sitio de *N*-glicosilación (rhIFN- α 2bD77N) y otra variante de la citoquina con cuatro sitios de *N*-glicosilación (rhIFN- α 2b4N) presentes en sobrenadantes de cultivo de líneas celulares CHO recombinantes (Fig. 25). La determinación fue realizada utilizando el ensayo de rectas paralelas. Las curvas se realizaron por triplicado, utilizándose el estándar internacional de la OMS para el rhIFN- α 2b no glicosilado producido en *E. coli* (NIBSC 95/566).

De la misma manera que para el ensayo de valoración de la actividad antiviral, la validación del ensayo se llevó a cabo mediante un ANOVA, que permitió determinar la existencia de linealidad, regresión y paralelismo para la curva del estándar y de la muteína con un sitio de *N*-glicosilación. Sin embargo, no se comprobó la existencia de paralelismo entre la curva del estándar y la correspondiente a la variante con cuatro sitios de *N*-glicosilación, lo cual es condición necesaria para realizar la cuantificación en forma confiable.

La reproducibilidad del ensayo se calculó mediante la valoración biológica de una muestra de la variante con un sitio de *N*-glicosilación rhIFN- α 2bD77N, que se realizó por triplicado dentro de un mismo ensayo y se repitió en tres ocasiones diferentes. Los CV intra e inter-ensayo se calcularon utilizando la ecuación 49 (sección 1.1.3). El valor promedio de los CV intra-ensayo fue del $8,7 \pm 5,0\%$ (valor promedio de los coeficientes \pm SEM, $n=9$), mientras que el CV inter-ensayo fue del 28,1%, ambos valores apropiados para este tipo de ensayos. Por otro lado, el error cometido en la estimación de la potencia de una muestra de la variante rhIFN- α 2b4N es mayor ya que, debido a la ausencia de paralelismo entre la muestra y el estándar, el resultado obtenido dependerá del sector de la zona lineal de la curva del estándar en el que se realice la interpolación. Para todos aquellos casos de cuantificación de variantes glicosiladas del rhIFN- α 2b donde no se verificó la existencia de paralelismo, se optó por una solución de compromiso calculando la actividad biológica de la misma en la zona correspondiente a una respuesta igual al 50% de la máxima proliferación celular alcanzada en ausencia de citoquina.

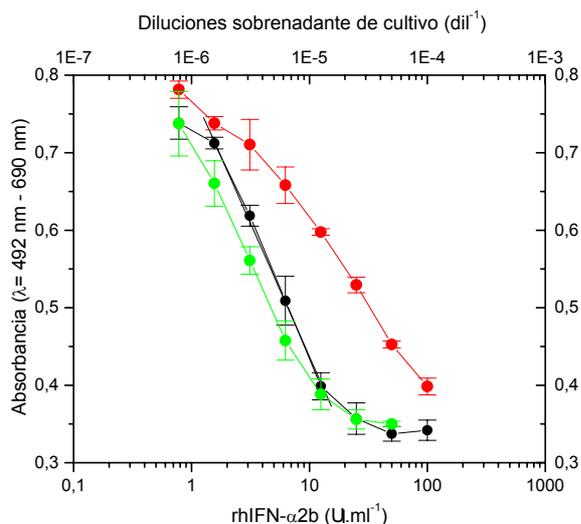


Fig. 25. Valoración de la actividad biológica antiproliferativa *in vitro* de dos variantes *N*-glicosiladas del rhIFN- α 2b.

La valoración de la actividad biológica de la variante con un sitio de *N*-glicosilación rhIFN- α 2bD77N (●) y de la variante con cuatro sitios de *N*-glicosilación rhIFN- α 2b4N (●), presentes en sobrenadantes de cultivo de líneas CHO recombinantes, fue realizada frente al estándar internacional de la OMS para la citoquina no glicosilada (●). Las curvas correspondientes al estándar y las muestras fueron procesadas por triplicado y los resultados se muestran como el valor promedio \pm SD.

3. EVALUACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS DEL rhIFN- α 2b *WILD TYPE* A SER MODIFICADOS CON EL FIN DE INTRODUCIR SITIOS SUSCEPTIBLES DE *N*-GLICOSILACIÓN

La síntesis de la cadena polipeptídica de una *N*-glicosilproteína se encuentra bajo control genético. Contrariamente, los oligosacáridos son adicionados a un residuo de Asn presente en la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr de la proteína y procesados por una serie de reacciones enzimáticas en ausencia de la estricta dirección de los ácidos nucleicos. Por lo tanto, la presencia de la secuencia consenso no garantiza la existencia de glicosilación. Se estima que entre 10 y 30% de los sitios potenciales de *N*-glicosilación de glicoproteínas no se encuentran ocupados. La eficiencia de glicosilación depende de muchos factores, entre ellos la estructura primaria, secundaria y terciaria de la proteína (Rudd y Dwek, 1997).

Con el objeto de seleccionar las posiciones aminoacídicas a mutar en la secuencia *wild type* del rhIFN- α 2b de manera de crear en forma artificial sitios potenciales de *N*-glicosilación, se decidió llevar a cabo el menor número de cambios posible en la secuencia proteica. Teniendo en cuenta el tripéptido consenso para *N*-glicosilación (Asn-X-Ser/Thr), se analizaron dos estrategias:

- Localización de todos los residuos de Ser y/o Thr en la secuencia aminoacídica del rhIFN- α 2b *wild type* (tercera posición de la secuencia consenso) y cambio del aminoácido en posición -2 por Asn (primera posición del tripéptido consenso).
- Ubicación de todos los residuos de Asn presentes en la secuencia del rhIFN- α 2b *wild type* (primera posición de la secuencia consenso) y cambio del aminoácido en posición +2 por Thr, dado que se ha reportado que la presencia de Thr en la tercera posición de la secuencia consenso resulta en un grado de ocupación entre

dos y tres veces superior que si esa misma posición se encuentra ocupada por Ser (Kasturi y col., 1995).

Una vez identificados dichos aminoácidos, los 28 sitios potenciales de *N*-glicosilación resultantes de las correspondientes mutaciones fueron estudiados en forma teórica en cuanto a su probabilidad de glicosilación y conservación de la actividad biológica de la proteína (Tabla III).

El primer aspecto se evaluó con el propósito de generar, en lo posible, un alto grado de ocupación de los sitios de *N*-glicosilación. Para ello, se analizaron las siguientes características:

- Probabilidad de glicosilación teniendo en cuenta la información presente en bases de datos de glicoproteínas conocidas. Este parámetro se determinó empleando el programa *NetNGlyc 1.0 Server* (Gupta y Brunak, 2002; www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/).
- Eficiencia de glicosilación teniendo en cuenta la posición del sitio analizado con respecto a la longitud total de la proteína. Se ha demostrado que la frecuencia de tripéptidos no glicosilados aumenta a medida que los mismos se acercan al extremo *C*-terminal de la proteína (Nilsson y von Heijne, 2000), si bien los sitios cercanos a ambos extremos de la proteína pueden ser glicosilados en forma menos eficiente.
- Estructura del aminoácido central (X) del sitio consenso de glicosilación. La presencia de Pro bloquea completamente la glicosilación, mientras que secuencias conteniendo Trp, Asp, Glu y Leu son ocupadas en forma menos eficiente (Shakin-Eshleman y col., 1996). Otro factor que inhibe la glicosilación es la presencia de Pro inmediatamente después del sitio.

Por otro lado, se identificaron las mutaciones que se podrían introducir sin causar una distorsión significativa de la estructura terciaria de la proteína, con el fin de evitar la pérdida de su actividad biológica, analizando los siguientes aspectos:

- Cercanía del sitio susceptible de *N*-glicosilación a la región molecular del rhIFN- α 2b involucrada en la unión al receptor. La mutación de un aminoácido que forma parte del sitio de interacción con el receptor o la unión de cadenas hidrocarbonadas a residuos cercanos al mismo podrían disminuir la afinidad del complejo y derivar en formas biológicamente inactivas del rhIFN- α 2b. Este estudio se basó en los resultados encontrados por Piehler y col. (2000) con respecto a la interacción del rhIFN- α 2b con la subunidad ifnar2 del receptor, y los descriptos por Roisman y col. (2005) con respecto a su interacción con la subunidad ifnar1 (sección 3.3 del apartado Introducción).
- Área superficial accesible al solvente (*accessible surface area, ASA*) del aminoácido ubicado en la primera posición de la secuencia consenso (Asn u otro aminoácido mutado por Asn). Este estudio proporciona información relacionada con el grado de exposición superficial del aminoácido al cual se uniría la cadena de oligosacáridos. Dado que la glicosilación es un proceso co-traduccional, si este residuo se encuentra en el interior de la citoquina nativa, la adición de carbohidratos podría impedir el correcto plegamiento de la proteína, resultando en una alteración de la estructura terciaria con posibles consecuencias en su función biológica. Este parámetro se calculó utilizando el programa informático *ASAview* (Ahmad y col., 2004; <http://www.netasa.org/asaview/>).

La Tabla XIII resume los aspectos analizados para todos los aminoácidos susceptibles de ser mutados de manera de generar el sitio consenso Asn-X-Ser/Thr. Para realizar la selección, se tomaron diferentes criterios de acuerdo con el parámetro evaluado. En primer lugar, se escogieron los residuos cuya probabilidad de glicosilación (*NetNglyc 1.0 server*) fuera por lo menos del 40%, por lo que no se consideró apropiada la construcción de las variantes de rhIFN- α 2b D71N, T106N, K134N, M148N y S152N. Si bien se sabe que la glicosilación es menos eficiente cuando el tripéptido consenso se encuentra cercano a ambos extremos de la proteína, algunos autores han reportado la existencia de una mayor proporción de glicoproteínas con sitios glicosilados cercanos al extremo *N*-terminal que con sitios glicosilados cercanos al extremo *C*-terminal (Elliott y col., 2004). Se ha sugerido que la unión de carbohidratos no ocurre en posiciones *C*-terminales debido al poco tiempo remanente para realizar la unión del oligosacárido a una proteína que se encuentra casi completamente sintetizada. De acuerdo con estas evidencias, las muteínas derivadas del rhIFN-2b K134N, M148N, S150N, S152N, S153N, Q158T, Q158N y L161N se excluyeron de la estrategia de glicoingeniería. Por otro lado, no se observó la presencia de Pro como aminoácido central del tripéptido consenso en ninguna de las variantes analizadas. En diez posibles muteínas se encontraron otros aminoácidos en esta posición (Leu, Glu y Asp) que, debido a su tamaño e hidrofobicidad, podrían provocar una conformación local desfavorable para la adición de oligosacáridos. Sin embargo, teniendo en cuenta que la frecuencia de glicosilación de sitios con estas características es variable según la proteína, se consideró la construcción de dichas muteínas. Por el contrario, dado que es sabido que la presencia de Pro inmediatamente después de la secuencia consenso bloquea completamente la glicosilación, este criterio se utilizó para confirmar la exclusión de las variantes del rhIFN- α 2b T106N y K134N. Sumado a esto, en el rhIFN- α 2b *wild type*, la T106 se encuentra unida a un oligosacárido a través de un enlace *O*-glicosídico.

Desde otro enfoque, la selección se centró en la mutación de residuos que no estuviesen involucrados en la interacción con el receptor, permitiendo descartar los análogos de rhIFN- α 2b R12N y L26N, y confirmar la eliminación de las variantes M148N, S150N, S152N y L153N, las cuales también presentaron una baja exposición al solvente. Para evitar una desestabilización de la estructura proteica por alteración de residuos no expuestos en la superficie de la proteína, se tomó como criterio de rechazo un área superficial accesible al solvente (ASA) inferior al 30%, como presentaron las muteínas L26N, A50N, L66N, F67N, F84N y G104N y el grupo de muteínas M148N, S150N, S152N y L153N que fueron descartadas previamente por otros criterios.

De esta manera, se seleccionaron 11 muteínas del rhIFN- α 2b que cumplieron con la mayoría de los requisitos establecidos: P4N, T6N, L9N, R23N, F47T, F67T, K70N, D77N, L95T, E113N y R125N. Además, con el fin de estudiar y discutir los criterios adoptados, se decidió construir tres muteínas cuyos sitios consenso de *N*-glicosilación no cumplieran alguna de las características mencionadas: rhIFN- α 2bR12N (cuya interacción con el receptor no se encuentra confirmada), rhIFN- α 2bF67N (cuya superficie de exposición al solvente es nula) y rhIFN- α 2bQ158T (que se encuentra muy cerca del extremo *C*-terminal de la proteína).

Tabla XIII. Análisis teórico de los sitios potenciales de *N*-glicosilación del rhIFN- α 2b generados por la mutación de un único aminoácido.

Muteína*	Asn o aminoácido reemplazado por Asn**	Parámetros para evaluar la probabilidad de glicosilación del sitio Asn-X-Ser/Thr-Y			Parámetros para evaluar la conservación de la actividad biológica	
		Probabilidad de glicosilación (%)	Eficiencia de glicosilación (localización de la secuencia consenso)	Aminoácido central (X) o posterior al sitio (Y)***	Interacción con el receptor	ASA (%)
P4N	P4	57	Baja	-	No	34,5
T6N	T6	59	Baja	-	No	81,5
L9N	L9	64	Baja	-	No	32,8
R12N	R12	69	Alta	-	Probable	39,7
R23N	R23	64	Alta	-	No	48,6
L26N	L26	62	Alta	-	Sí	21,8
F47T	N45	58	Alta	-	No	83,3
A50N	A50	57	Alta	E (X)	No	18,1
L66N	L66	45	Alta	-	No	7,6
F67T	N65	72	Alta	L (X)	No	58,7
F67N	F67	71	Alta	-	No	0,0
K70N	K70	55	Alta	D (X)	No	74,4
D71N	D71	39	Alta	-	No	39,5
D77N	D77	60	Alta	E (X)	No	47,8
F84N	F84	59	Alta	-	No	0,0
L95T	N93	69	Alta	D (X)	No	62,2
G104N	G104	57	Alta	-	No	7,6
T106N	T106	11	Alta	E(X), P(Y)	No	57,7
E113N	E113	46	Alta	D (X)	No	55,5
R125N	R125	59	Alta	-	No	51,1
K134N	K134	12	Baja	P(Y)	No	81,7
M148N	M148	36	Baja	-	Sí	24,5
S150N	S150	49	Baja	-	Sí	0,0
S152N	S152	36	Baja	L (X)	Sí	26,4
L153N	L153	52	Baja	-	Sí	16,9
Q158T	N156	60	Baja	L (X)	No	39,6
Q158N	Q158	46	Baja	E (X)	No	43,1
L161N	L161	46	Baja	-	No	45,9

* Las muteínas se denominaron de la siguiente manera: aminoácido presente en la proteína *wild type*, posición en la cadena polipeptídica, aminoácido presente en la proteína mutada (Asn o Thr).

** Se indica la Asn o el residuo sustituido por Asn susceptible de ser *N*-glicosilado.

*** Se muestran sólo aquellos aminoácidos cuya presencia puede resultar en una glicosilación ineficiente.

En rojo se señalan los criterios que determinaron el rechazo de la construcción de determinadas muteínas.

4. CONSTRUCCIÓN DE MUTEÍNAS DEL rhIFN- α 2b CON UN SITIO DE *N*-GLICOSILACIÓN

La construcción de las 14 muteínas con un sitio de *N*-glicosilación seleccionadas de acuerdo con el análisis teórico realizado (sección 3) se llevó a cabo a partir del rhIFN- α 2b *wild type*, con el objetivo final de elegir las más apropiadas para desarrollar variantes hiperglicosiladas de la citoquina.

4.1. AISLAMIENTO DE LA REGIÓN CODIFICANTE DEL hIFN- α 2b

Existen diversas fuentes a partir de las cuales se puede obtener la secuencia codificante de una proteína de interés. Si se cuenta con una biblioteca genómica o de ADNc perteneciente al organismo de origen de dicha secuencia, el *screening* del gen se puede realizar

mediante el uso de sondas o PCR. De lo contrario, es necesario preparar ADN a partir de tejidos, células sanguíneas, etc., para utilizar como molde para una reacción de PCR (Turner y col., 2000). Una de las características más atractivas de la reacción de PCR es que la cantidad y la calidad de la muestra de ADN sujeta a la amplificación no necesitan ser altas. Una única célula o un lisado crudo preparado por simple calentamiento de células en agua podrían ser adecuados para una amplificación exitosa. No obstante, un requisito esencial es que la muestra contenga al menos una hebra de ADN intacta que comprenda la región que se desea aislar y que las impurezas se encuentren lo suficientemente diluidas como para no inhibir la polimerización (Saiki, 1990).

El aislamiento del gen del hIFN- α 2b se realizó a partir de ADN genómico celular. Para ello, se realizó una extracción de ADN genómico de células de sangre periférica humana, obteniéndose una concentración de ADN de $125 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Luego de verificar la integridad del ADN aislado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,7% (P/V), se realizó una PCR con oligonucleótidos específicos que hibridan por fuera del ORF (*open reading frame*, marco abierto de lectura) del hIFN- α 2b. Se utilizaron como molde 125 ng de ADN genómico, realizándose un control negativo en ausencia de dicho molde. En la Fig. 26 se observa el fragmento amplificado, analizado en un gel de agarosa, cuyo tamaño coincide con el esperado para la región del gen del hIFN- α 2b que se deseaba aislar. El fragmento completo posee 673 pb, de las cuales 653 pb pertenecen al gen de la citoquina y 20 pb corresponden al agregado de sitios de restricción.

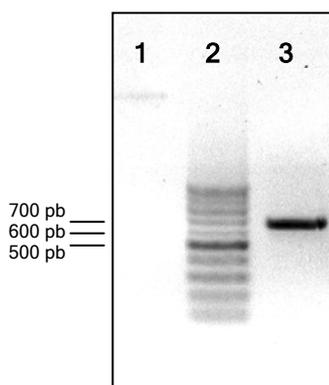


Fig. 26. Aislamiento del gen del hIFN- α 2b mediante PCR empleando ADN genómico de células sanguíneas.

Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1% (P/V).

Calles: 1: Control negativo.

2: Marcador de masa molecular (CIEN marker).

3: Fragmento amplificado de 673 pb.

4.2. CLONADO DEL GEN DEL hIFN- α 2b EN EL PLÁSMIDO pGEM[®]-T EASY

El plásmido pGEM[®]-T Easy ofrece una estrategia de clonado altamente eficiente, ya que permite la inserción directa de los amplicones obtenidos y un rápido *screening* de colonias azules y blancas. Además, constituye una herramienta potencial que facilita el clonado posterior en diferentes plásmidos de expresión.

Luego de purificar el fragmento correspondiente al gen del hIFN- α 2b a partir del gel de agarosa, se adicionó el nucleótido dATP al extremo 3' del amplicón y el mismo se ligó al plásmido pGEM[®]-T Easy. La mezcla de ligación se utilizó para transformar células de *E. coli*

DH5 α F'1q, las cuales se crecieron en placas conteniendo medio agar-LB suplementado con ampicilina, X-Gal e IPTG. El análisis de las colonias transformadas se realizó por digestión del ADN plasmídico obtenido de colonias blancas elegidas al azar con las enzimas *Eco*R I y *Xba* I. Como se observa en la Fig. 27, el ADN plasmídico de todas las colonias analizadas liberó un inserto del tamaño adecuado. Se seleccionaron tres clones (α 2, α 3 y α 5) para realizar el secuenciamiento automático del ADN plasmídico. Todas las secuencias mostraron que el fragmento de ADN clonado corresponde al hIFN- α 2b, de acuerdo con la secuencia publicada en el *GenBank*. De esta manera, se escogió el clon α 2, el cual fue denominado pGEM[®]-T Easy-IFN- α 2b *wild type*.

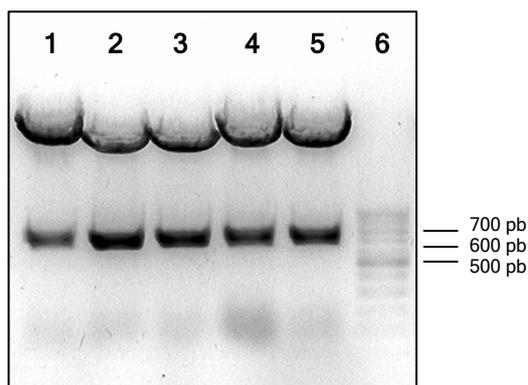


Fig. 27. Clonado del gen del hIFN- α 2b en el vector pGEM[®]-T Easy.

Los plásmidos pGEM[®]-T Easy obtenidos de colonias blancas escogidas al azar fueron digeridos con las enzimas *Eco*R I y *Xba* I y analizados en un gel de agarosa al 1% (P/V).

Calles: 1 a 5: Colonias α 1 a α 5.

6: Marcador de masa molecular (CIEN marker).

4.3. SUBCLONADO DEL GEN DEL hIFN- α 2b EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN pCI-NEO

El gen del hIFN- α 2b fue obtenido mediante digestión del plásmido pGEM[®]-T Easy-IFN- α 2b *wild type* con las enzimas *Eco*R I y *Xba* I, lo que permitió posteriormente clonarlo en el plásmido para expresión en células eucariotas pCI-neo, digerido con las mismas enzimas y desfosforilado. Se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α F'1q competentes con la mezcla de ligación y se seleccionaron en placas conteniendo agar-LB suplementado con ampicilina. Se escogieron al azar clones bacterianos y se analizó la presencia del inserto mediante digestión de su ADN plasmídico con las enzimas *Eco*R I y *Xba* I (Fig. 28). Todos los clones analizados fueron positivos, por lo que se seleccionó uno de ellos, el cual se denominó pCI-neo-rhIFN- α 2b *wild type*.

El secuenciamiento del clon elegido confirmó la identidad del fragmento de ADN clonado en el plásmido pCI-neo-rhIFN- α 2b *wild type*, demostrando un 100% de homología con la secuencia del gen del hIFN- α 2b publicada en el *GenBank* (Fig. 29).

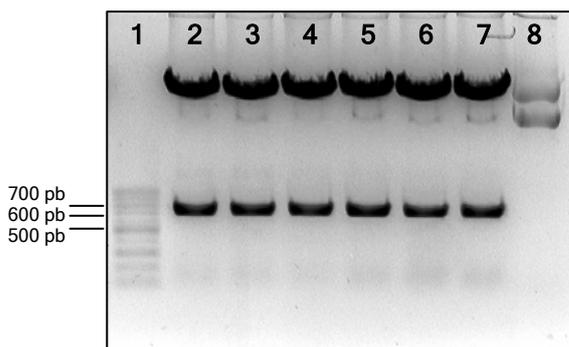


Fig. 28. Clonado del gen del hIFN- α 2b en el vector pCI-neo.
 Los plásmidos pCI-neo obtenidos de colonias escogidas al azar fueron digeridos con las enzimas *EcoR* I y *Xba* I y analizados en un gel de agarosa al 1% (P/V).
 Calles: 1: Marcador de masa molecular (CIEN marker).
 2 a 7: Colonias 1 a 6.
 8: Control de plásmido pCI-neo sin digerir.

1	ATGGCCTTGA	CCTTTGCTTT	ACTGGTGGCC	CTCCTGGTGC	TCAGCTGCAA
51	GTCAAGCTGC	TCTGTGGGCT	GTGATCTGCC	TCAAACCCAC	AGCCTGGGTA
101	GCAGGAGGAC	CTTGATGCTC	CTGGCACAGA	TGAGGAGAAT	CTCTCTTTTC
151	TCCTGCTTGA	AGGACAGACA	TGACTTTGGA	TTTCCCCAGG	AGGAGTTTGG
201	CAACCAGTTC	CAAAAAGGCTG	AAACCATCCC	TGTCCTCCAT	GAGATGATCC
251	AGCAGATCTT	CAATCTCTTC	AGCACAAAAG	ACTCATCTGC	TGCTTGGGAT
301	GAGACCCTCC	TAGACAAATT	CTACACTGAA	CTCTACCAGC	AGCTGAATGA
351	CCTGGAAGCC	TGTGTGATAC	AGGGGGTGGG	GGTGACAGAG	ACTCCCCTGA
401	TGAAGGAGGA	CTCCATTCTG	GCTGTGAGGA	AATACTTCCA	AAGAATCACT
451	CTCTATCTGA	AAGAGAAGAA	ATACAGCCCT	TGTGCCTGGG	AGGTTGTCAG
501	AGCAGAAATC	ATGAGATCTT	TTTCTTTGTC	AACAAACTTG	CAAGAAAGTT
551	TAAGAAGTAA	GGAATGA			

Fig. 29. Secuencia correspondiente al ORF del hIFN- α 2b (*GenBank*).

4.4. MUTAGÉNESIS SITIO DIRIGIDA DEL rhIFN- α 2b

Se han desarrollado una gran variedad de métodos para introducir mutaciones dirigidas en genes clonados, las cuales pueden clasificarse en deleciones o inserciones simples o sistemáticas, sustituciones de grupos de nucleótidos o mutaciones puntuales donde se reemplaza una única base. La técnica de PCR ha evolucionado en numerosas estrategias que permiten generar moléculas recombinantes mutadas de una manera mucho más sencilla y rápida con respecto a las técnicas clásicas. Las principales limitaciones de esta metodología incluyen el uso restringido a moléculas de menos de 5 kpb (de acuerdo con la enzima utilizada) y el error acumulativo introducido por la polimerasa luego de varios ciclos de amplificación (Silver y col., 1995).

La mutagénesis sitio-dirigida para la introducción de sitios susceptibles de *N*-glicosilación en el gen del rhIFN- α 2b se realizó utilizando la técnica de PCR, mediante la estrategia denominada extensión por solapamiento (ES-PCR). Para compensar los inconvenientes asociados a esta técnica, se utilizó la polimerasa Platinum[®] *Pfx*, la cual posee actividad exonucleasa 3'-5', por lo que provee una alta fidelidad de replicación, y una elevada procesividad.

Para la construcción de las 14 muteínas con un sitio de *N*-glicosilación se procedió de la siguiente manera. En las dos reacciones de la primera etapa de PCR, se utilizó como molde el plásmido pCI-neo-rhIFN- α 2b *wild type*. En cada reacción se utilizó un oligonucleótido externo (IFNalfaF o IFNalfaR, comunes a todas las variantes) y un oligonucleótido interno (específico para cada variante), en sentido *forward* o *reverse* según corresponda, para generar dos fragmentos (A y B) que serían posteriormente unidos en la segunda etapa. La Fig. 30 muestra un ejemplo de la primera etapa de PCR para la obtención de las variantes rhIFN- α 2bL9N (Fig. 30A), rhIFN- α 2bK70N (Fig. 30B) y rhIFN- α 2bQ158T (Fig. 30C). Para todas las muteínas del rhIFN- α 2b se obtuvieron dos fragmentos del tamaño adecuado con un elevado rendimiento (Tabla IV, sección 13.5 de Materiales y Métodos).

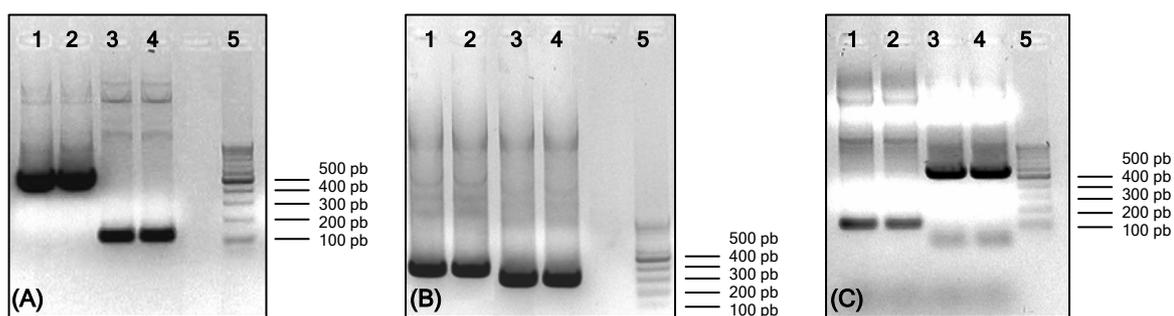


Fig. 30. Primera etapa de PCR para la mutagénesis sitio-dirigida del rhIFN- α 2b.

Los productos de PCR de las dos reacciones se analizaron en geles de agarosa al 1,5% (P/V). El volumen de reacción se dividió en dos fracciones y se sembró en dos calles. Se ejemplifica la obtención de tres variantes:

- (A) rhIFN- α 2bL9N. Calles: 1-2: Fragmento A (576 pb).
3-4: Fragmento B (127 pb).
5: Marcador de masa molecular (CIEN marker).
- (B) rhIFN- α 2bK70N. Calles: 1-2: Fragmento A (390 pb).
3-4: Fragmento B (316 pb).
5: Marcador de masa molecular (CIEN marker).
- (C) rhIFN- α 2bQ158T. Calles: 1-2: Fragmento A (127 pb).
3-4: Fragmento B (576 pb).
5: Marcador de masa molecular (CIEN marker).

Los fragmentos se purificaron a partir del gel y se utilizaron como molde para la segunda etapa de la mutagénesis, que consistió en una reacción de PCR para unir los dos fragmentos individuales, utilizando los oligonucleótidos externos para amplificar el gen del rhIFN- α 2b completo con la mutación correspondiente. En la Fig. 31 se observan los productos de la reacción de unión para las variantes rhIFN- α 2bL9N, rhIFN- α 2bK70N y rhIFN- α 2bQ158T. El tamaño de los fragmentos coincide con el esperado para la amplificación del gen del rhIFN- α 2b con los cebadores IFNalfaF e IFNalfaR (673 pb).

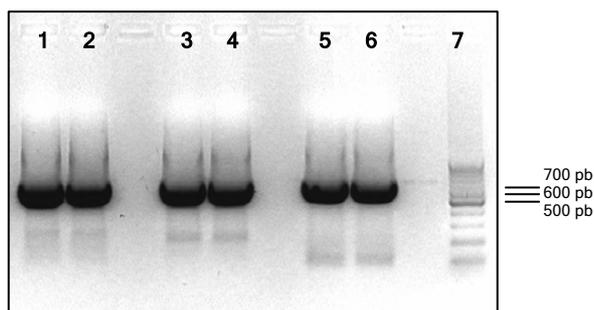


Fig. 31. Segunda etapa de PCR para la mutagénesis sitio-dirigida del rhIFN- α 2b.
 Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 1,5% (P/V). El volumen de reacción se dividió en dos fracciones y se sembró en dos calles. Se ejemplifica la obtención de tres variantes.
 Calles: 1-2: rhIFN- α 2bL9N.
 3-4: rhIFN- α 2bK70N.
 5-6: rhIFN- α 2bQ158T.
 7: Marcador de masa molecular (CIEN marker).

4.5. CLONADO DE LOS GENES DE LAS MUTEÍNAS DEL rhIFN- α 2b EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN pCI-NEO

Los fragmentos de ADN correspondientes a los genes de las muteínas del rhIFN- α 2b, obtenidos mediante la segunda reacción de PCR, fueron escindidos del gel de agarosa y purificados. Posteriormente, se digirieron con las enzimas *EcoR* I y *Xba* I y se purificaron a partir de la solución, con el fin de eliminar las enzimas de restricción, sales y los fragmentos de ADN residuales cortos provenientes de la digestión. Los productos obtenidos se ligaron al plásmido para expresión en células eucariotas pCI-neo, linealizado con las mismas enzimas y desfosforilado. Se transformaron bacterias *E. coli* DH5 α F'1q competentes con la mezcla de ligación y se seleccionaron en placas conteniendo agar-LB suplementado con ampicilina. La presencia del inserto en las colonias transformadas se analizó mediante preparación de ADN plasmídico y digestión con las enzimas *EcoR* I y *Xba* I. Se obtuvieron clones positivos para cada una de las 14 variantes del rhIFN- α 2b. Para verificar el éxito de las mutaciones realizadas, se realizó el secuenciamiento del ADN plasmídico de un clon de cada muteína. Todas las secuencias demostraron la presencia de las mutaciones correspondientes en el gen del rhIFN- α 2b, observándose que no se introdujo ninguna otra mutación no deseada durante el procedimiento.

Finalmente, se realizó una preparación de ADN plasmídico de los clones seleccionados con el fin de obtener material de pureza adecuada para su uso en la transfección de células de mamífero.

5. CARACTERIZACIÓN DE LAS MUTEÍNAS DEL rhIFN- α 2b CON UN SITIO DE N-GLICOSILACIÓN

5.1. TRANSFECCIONES TRANSITORIAS DE CÉLULAS CHO.K1

La transfección de células eucariotas con ADN exógeno puede llevar a una expresión transitoria o estable del gen de interés. La expresión transitoria tiene la ventaja de generar en forma rápida cantidades moderadas de producto durante un período de tiempo, hasta que las nucleasas celulares hayan degradado el ADN foráneo. De esta manera, permite evaluar la

integridad del vector de expresión y llevar a cabo una caracterización preliminar del producto, en lo referente a la secreción de la proteína y la presencia de modificaciones post-traduccionales. Por este motivo, los sistemas de transfección transitoria son de gran utilidad para el estudio de varios genes o mutantes al mismo tiempo (Hauser, 1997). Además, actualmente la expresión transitoria a gran escala en células de mamífero se ha convertido en una poderosa tecnología para la rápida producción de grandes cantidades (en el orden de miligramos o hasta gramos) de proteínas recombinantes (Wurm y Bernard, 1999).

Con el fin de caracterizar las muteínas derivadas del rhIFN- α 2b con un sitio de *N*-glicosilación en cuanto a su actividad biológica específica y grado de glicosilación, se realizaron transfecciones transitorias de células CHO.K1 con los plásmidos de expresión correspondientes. Se utilizaron las condiciones de lipofección optimizadas previamente en el laboratorio para la línea celular CHO.K1 (Zuqueli, 2006). Se realizaron 16 transfecciones transitorias independientes en pozos de placas de 6 cavidades: una de ellas con el plásmido pCI-neo-rhIFN- α 2b *wild type*, catorce con los plásmidos conteniendo las muteínas del rhIFN- α 2b con un sitio de *N*-glicosilación (P4N, T6N, L9N, R12N, R23N, F47T, F67T, F67N, K70N, D77N, L95T, E113N, R125N y Q158T) y una en ausencia de plásmido (control negativo).

Transcurridas 72 h post-transfección, se cosechó el sobrenadante de cada cultivo y se conservó para su posterior análisis.

5.2. CUANTIFICACIÓN DEL rhIFN- α 2b *WILD TYPE* Y SUS MUTEÍNAS MEDIANTE TÉCNICA DE ELISA *SANDWICH*

Teniendo en cuenta que la detectabilidad de la técnica de ELISA *sandwich* para los mAbs seleccionados es mayor que la correspondiente a la técnica de ELISA de competición, se utilizó este sistema para cuantificar el rhIFN- α 2b *wild type* y las muteínas derivadas de la citoquina presentes en los sobrenadantes de cultivo obtenidos mediante transfección transitoria de células CHO.K1.

Para ello, se evaluaron los cuatro mAbs seleccionados previamente (CA1A3, CA5E6, CB15D7 y CA9C3), que mapean áreas moleculares diferentes del rhIFN- α 2b no glicosilado, como anticuerpos de captura del antígeno. Esta experiencia tuvo como objeto estudiar la influencia de los sitios potenciales de *N*-glicosilación (ya sea por la mutación de un aminoácido o por la unión de carbohidratos a la proteína) a nivel del reconocimiento de las muteínas del rhIFN- α 2b por parte de los diferentes mAbs. En la Tabla XIV se muestra la cuantificación de las diferentes variantes del rhIFN- α 2b presentes en los sobrenadantes de cultivo, utilizando como estándar rhIFN- α 2b no glicosilado.

En general, se observó que los cuatro mAbs de captura interaccionaron en forma diferente con las muteínas del rhIFN- α 2b, confirmando que la unión al antígeno ocurre a través de distintos epitopes.

Tabla XIV. Cuantificación de las variantes del rhIFN- α 2b mediante técnica de ELISA *sandwich* empleando diferentes mAbs de captura.

Variante del rhIFN- α 2b	Concentración determinada mediante técnica de ELISA <i>sandwich</i> (ng.ml ⁻¹)			
	mAb CA1A3	mAb CA5E6	mAb CA9C3	mAb CB15D7
<i>Wild type</i>	37,4	44,8	6,7	35,9
P4N	152,0	185,9	50,4	129,5
T6N	775,6	758,6	11,3	1.092,8
L9N	396,8	438,7	69,1	409,5
R12N	329,0	347,3	88,0	420,3
R23N	n/d	142,7	8,4	75,3
F47T	304,6	330,9	n/d	360,3
F67T	2,2	n/d	n/d	n/d
F67N	n/d	n/d	n/d	n/d
K70N	97,6	220,6	31,2	147,6
D77N	132,7	153,1	21,3	117,9
L95T	137,4	118,6	7,9	153,1
E113N	1.206,7	1.293,8	182,2	n/d
R125N	1.128,6	n/d	139,7	974,2
Q158T	1.192,6	1.139,4	227,7	1.234,1

En negrita se remarcán las variantes del rhIFN- α 2b no detectadas (n/d) por un determinado mAb.

Sin embargo, ninguno de los mAbs evaluados fue capaz de reconocer a la variante rhIFN- α 2bF67N. Este resultado es coherente, teniendo en cuenta que dicha muteína se construyó como un control debido a que la accesibilidad al solvente de la Phe en la posición 67 es nula. Por ende, tanto la sustitución de dicho aminoácido, de características hidrofóbicas, por un residuo polar como la Asn como la potencial presencia de una cadena hidrocarbonada unida a dicho residuo podrían desestabilizar completamente la estructura de la molécula. La modificación de un aminoácido hidrofóbico que se encuentra oculto dentro de la proteína por otro aminoácido de propiedades fisicoquímicas opuestas resultaría en una alteración estructural de tal magnitud que impediría que cualquier anticuerpo dirigido contra la molécula nativa sea capaz de interactuar con esta variante. No obstante, otra posibilidad, igualmente relacionada con una distorsión a nivel estructural, es que dicha muteína no se haya expresado en cantidades detectables en el sobrenadante de cultivo. La biosíntesis de proteínas de secreción en el retículo endoplasmático (RE) produce estructuras correctamente plegadas y ensambladas con actividad biológica intacta. Dicha fidelidad se mantiene mediante mecanismos de control de calidad dentro del RE, los cuales dependen de sistemas de chaperonas que monitorean y contribuyen al proceso de plegamiento. Cuando el plegamiento es incorrecto o incompleto, las proteínas son retenidas en el RE y eventualmente dirigidas al citosol para su degradación por el proteosoma de ubiquitina. La retención de proteínas plegadas inadecuadamente puede ocurrir luego de su paso por el RE, resultando en su degradación en los lisosomas (Trombetta y Parodi, 2003; Wu y col., 2006). De esta manera, la mutación del residuo Phe67 por Asn en el rhIFN- α 2b, sumado a la unión de carbohidratos a dicho residuo, podría generar estructuras que no superen este control de calidad en el RE, impidiendo su liberación al exterior celular.

Por otro lado, la variante rhIFN- α 2bF67T tampoco fue reconocida por los mAbs evaluados, con excepción del mAb CA1A3, que detectó una concentración muy baja en el sobrenadante de cultivo. En este caso, la Asn ubicada en la posición 65, donde se produciría la *N*-glicosilación, se encuentra en la superficie de la proteína nativa (ASA \approx 60%). Por este motivo, es probable que la mutación del residuo Phe67 a Thr sea la responsable de la distorsión de la estructura tridimensional de la molécula, que conduce a que la misma no se exporte o no sea reconocida por los mAbs. Teniendo en cuenta que el mAb CA1A3 presentó el menor límite de detección en el ensayo de ELISA, es posible que, debido al mecanismo de control de calidad de la célula en el RE, esta citoquina no sea producida en cantidades detectables para el resto de los mAbs.

El mAb CA1A3 no fue capaz de reconocer a la variante rhIFN- α 2bR23N e interactuó con el rhIFN- α 2bK70N con menor afinidad, lo que se evidenció en un cambio de la pendiente de la curva con respecto a la de la curva estándar en el ensayo de ELISA (resultados no mostrados), resultando en una subvaloración de la concentración de la citoquina en relación a la obtenida con los mAbs CA5E6 y CB15D7. Se ha encontrado que el mAb CA1A3 evidencia mayor capacidad neutralizante de la actividad biológica antiviral *in vitro* del rhIFN- α 2b con respecto a la del rhIFN- α 2a (Depetris, 2008). Debido a que ambas citoquinas sólo difieren en el aminoácido presente en la posición 23 (Arg en el rhIFN- α 2b y Lys en el rhIFN- α 2a), los resultados obtenidos indican que esta posición es clave en el reconocimiento de la molécula por parte de este anticuerpo. De esta manera, la mutación de dicho residuo o la presencia de oligosacáridos unidos al mismo en la variante rhIFN- α 2bR23N afectarían considerablemente la interacción, impidiendo la captura de la citoquina en el ensayo de ELISA *sandwich*.

La cuantificación de la molécula de rhIFN- α 2b *wild type* mediante técnica de ELISA *sandwich* arrojó valores de concentración similares cuando se utilizaron los mAbs CA1A3, CA5E6 y CB15D7 como anticuerpos de captura, mientras que al emplear el mAb CA9C3 la concentración estimada fue aproximadamente 6 veces inferior. Teniendo en cuenta que la obtención de los anticuerpos se realizó utilizando como inmunógeno el rhIFN- α 2b de origen bacteriano, este resultado indicaría que la presencia de *O*-glicosilación en la Thr106 afectaría la interacción de la citoquina con el mAb CA9C3. Esta subvaloración de la concentración mediante el empleo del mAb CA9C3 se extendió al resto de los análogos de rhIFN- α 2b con un sitio de *N*-glicosilación, los cuales probablemente presenten isoformas *O*-glicosiladas, *N*-glicosiladas y *N,O*-glicosiladas. No obstante, la concentración determinada para algunas variantes fue aún menor que la que debería esperarse por la mera presencia de *O*-glicosilación en la Thr106. Las muteínas rhIFN- α 2bT6N, rhIFN- α 2bR23N y rhIFN- α 2bL95T se unieron con menor afinidad al mAb CA9C3, lo que se reflejó en una menor pendiente de la curva dosis-respuesta con respecto a la de la curva estándar en el ensayo de ELISA. Por otro lado, la variante rhIFN- α 2bF47T directamente no fue reconocida por dicho mAb. En la estructura terciaria del hIFN- α 2b, las posiciones 6, 47, 95 y 106 se encuentran agrupadas en un polo de la molécula, constituyendo la región molecular a la cual se uniría el mAb CA9C3. Por otra parte, la posición 23 se encuentra en el extremo opuesto de dicha región, indicando que, de alguna manera, este residuo sería importante para el mantenimiento de la integridad de dicho epítipo.

El mAb CB15D7 interactuó, en mayor o menor medida, con todas las muteínas con un sitio de *N*-glicosilación, con excepción de rhIFN- α 2bE113N (además de las ya mencionadas F67N y F67T), para la cual se obtuvo una respuesta nula en el ensayo de ELISA *sandwich*. Adicionalmente, las variantes rhIFN- α 2bR23N y rhIFN- α 2bK70N fueron reconocidas con menor

afinidad, obteniéndose valores de concentración inferiores con respecto a las halladas con el mAb CA5E6.

Por último, el mAb CA5E6 fue capaz de reconocer a todos los derivados del rhIFN- α 2b, con excepción de la variante rhIFN- α 2bR125N, con la cual no exhibió interacción. En todos los casos, se comprobó la existencia de paralelismo entre las curvas de las muteínas con un sitio de *N*-glicosilación y la curva del estándar no glicosilado en el ensayo de ELISA, permitiendo realizar la cuantificación en forma confiable. Este comportamiento nos permitiría concluir que el mAb CA5E6 presentaría una afinidad similar hacia las diferentes variantes del rhIFN- α 2b y en algunos casos superior con respecto a los restantes anticuerpos. De esta manera, la concentración de las variantes, determinada utilizando el mAb CA5E6 como anticuerpo de captura, fue muy similar o superior a la obtenida con los mAbs CA1A3 y CB15D7, en los casos en que dichos anticuerpos exhibieron inconvenientes en el reconocimiento. En virtud de estos resultados, el mAb CA5E6 fue seleccionado como anticuerpo de captura apropiado para realizar la cuantificación de todas las muteínas con un sitio de *N*-glicosilación (excepto para rhIFN- α 2bF67T y rhIFN- α 2bR125N, las cuales se cuantificarán con los mAbs CA1A3 y CB15D7, respectivamente) con el fin de calcular, posteriormente, la actividad biológica específica de cada una de ellas.

5.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA ESPECÍFICA ANTIVIRAL Y ANTIPROLIFERATIVA DEL rhIFN- α 2b *WILD TYPE* Y SUS DERIVADOS

Tanto la mutación de aminoácidos como la interferencia de las cadenas de oligosacáridos pueden causar una pérdida severa de la función biológica del rhIFN- α 2b. Por este motivo, una condición primordial para aplicar esta estrategia de glicoingeniería es la preservación de la actividad biológica *in vitro* de la citoquina, ya sea en términos de su capacidad de inhibir la replicación viral como la proliferación celular.

Con el fin de determinar la actividad biológica específica del rhIFN- α 2b *wild type* y de las muteínas con un sitio de *N*-glicosilación, se realizó la cuantificación (mediante técnica de ELISA *sandwich* empleando el mAb CA5E6) y la valoración de la actividad biológica antiviral y antiproliferativa de las citoquinas presentes en los sobrenadantes de cultivo. La determinación de la concentración de las variantes rhIFN- α 2bF67T y rhIFN- α 2bR125N se realizó empleando los mAbs CA1A3 y CB15D7, respectivamente. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, reiterándose la experiencia en tres ocasiones diferentes. En la Tabla XV se muestran los resultados obtenidos para cada una de las variantes.

Los valores de actividad biológica específica obtenidos para la molécula del rhIFN- α 2b *wild type* concuerdan con los reportados para la proteína purificada a partir de leucocitos (Adolf y col., 1991) y de células Namalwa (Zoon y col., 1992), ambos inducidos por el virus Sendai, y con los reportados por Rossman y col. (1996) para la citoquina recombinante expresada en células NS0. En todos los casos se obtuvieron valores de actividad específica entre 150 y 220 UI.ng⁻¹, rango dentro del cual se encuentra el valor hallado en nuestro caso para la proteína recombinante expresada en células CHO.

La mayoría de las muteínas del rhIFN- α 2b con un sitio de *N*-glicosilación mostraron una actividad biológica específica comprendida dentro de dicho rango, es decir, sin mayores variaciones con respecto a la de la proteína nativa.

Sin embargo, la variante rhIFN- α 2bF67T presentó una actividad específica antiviral más de 10 veces inferior y una actividad biológica antiproliferativa más de 40 veces inferior con respecto a la del rhIFN- α 2b *wild type*. Este resultado concuerda con las hipótesis realizadas

anteriormente, ya que, por un lado, dado que la actividad biológica determinada en el sobrenadante de cultivo fue baja, es probable que la proteína no se exprese en grandes cantidades. Por otro lado, aquellas moléculas que son capaces de superar el control de calidad de la célula poseen menor bioactividad, probablemente debido a la alteración de su estructura terciaria.

Tabla XV. Actividad biológica específica antiviral y antiproliferativa de las variantes del rhIFN- α 2b con un sitio de *N*-glicosilación.

Variante del rhIFN- α 2b	Actividad biológica específica antiviral (UI.ng ⁻¹)	Actividad biológica específica antiproliferativa (UI.ng ⁻¹)
<i>Wild type</i>	196,5 ± 16,7	150,5 ± 14,6
P4N	266,8 ± 40,1	159,5 ± 51,4
T6N	186,9 ± 92,9	239,8 ± 5,5
L9N	192,6 ± 46,1	211,9 ± 54,7
R12N	177,0 ± 85,6	324,8 ± 60,4
R23N	283,2 ± 66,1	74,0 ± 13,2
F47T	190,9 ± 35,6	220,1 ± 45,1
F67T	13,0 ± 2,0	3,6 ± 0,8
F67N	*	*
K70N	117,3 ± 63,9	226,2 ± 35,5
D77N	164,0 ± 30,3	193,7 ± 94,1
L95T	96,1 ± 43,0	104,5 ± 47,4
E113N	221,9 ± 50,6	169,0 ± 43,5
R125N	198,9 ± 51,7	215,7 ± 56,1
Q158T	159,1 ± 67,2	191,4 ± 40,8

* La actividad biológica específica de esta variante no pudo determinarse debido a que no fue posible su cuantificación mediante técnica de ELISA *sandwich*.

La actividad biológica específica antiviral promedio de las variantes rhIFN- α 2bK70N y rhIFN- α 2bL95T fue inferior a los valores reportados, si bien el error de la determinación hace que se encuentre muy cercana al extremo inferior de dicho rango. No obstante, la actividad antiviral y antiproliferativa del rhIFN- α 2bL95T fue muy similar, mientras que el rhIFN- α 2bK70N conservó intacta su actividad antiproliferativa. El caso opuesto ocurrió con la variante rhIFN- α 2bR23N, la cual retuvo una actividad biológica antiviral similar a la de la molécula nativa, mientras que su actividad antiproliferativa se redujo.

Dado que la citoquina se une a un único receptor de la superficie celular para desencadenar la transducción de señales, se podría pensar que una única mutación debería afectar de la misma manera las diferentes funciones biológicas del rhIFN- α 2b. Contrariamente, la existencia de numerosos interferones con una alta homología, capaces de inducir actividades diferenciales sobre la misma célula, indica que sutiles diferencias en la secuencia aminoacídica podrían manifestarse en variaciones en sus funciones biológicas intrínsecas (Evinger y col., 1981; Foster y Finter, 1998). Se ha encontrado que la relación actividad antiviral/actividad inhibitoria del crecimiento no es constante entre las diferentes especies de IFN leucocitario. Roisman y col. (2005) sugirieron que la activación diferencial de los caminos de señalización que derivan en las diferentes actividades biológicas de los IFNs de tipo I depende de la afinidad de

unión hacia las diferentes subunidades del receptor. Estos autores realizaron experimentos de mutagénesis sitio-dirigida destinadas a estudiar el sitio de unión del rhIFN- α 2 a la subunidad ifnar1 del receptor. Los resultados revelaron que la mayoría de las mutaciones que produjeron un cambio (ya sea un aumento o una disminución) de la afinidad hacia ifnar1 tuvieron un efecto mayor sobre la actividad antiproliferativa que sobre la actividad antiviral. Esto indicaría, por un lado, que existen diferentes mecanismos de activación de ambos caminos, los cuales se ven influenciados por el tiempo de retención del complejo ternario formado por la citoquina y las subunidades ifnar1 e ifnar2 del receptor. Por otra parte, este resultado destaca la importancia de la interacción de la proteína con la subunidad ifnar1 para ejercer su actividad antiproliferativa. El rhIFN- β , cuya actividad antiproliferativa sobre células WISH es aproximadamente 50 veces superior con respecto a la del rhIFN- α 2, se une fuertemente al ifnar1, permitiendo la formación de un complejo ternario estable (Arduini y col., 1999). Esto no ocurre con el rhIFN- α 2, el cual se une primero con la subunidad ifnar2 y en un segundo paso se asocia en forma transitoria con ifnar1, disociándose y reasociándose rápidamente (Lamken y col., 2004).

Por lo tanto, la introducción de sitios de *N*-glicosilación en regiones involucradas en la interacción con alguna de las subunidades podría afectar la función antiproliferativa del rhIFN- α 2b en mayor medida que la antiviral, o viceversa, como ocurrió con las variantes rhIFN- α 2bR23N y rhIFN- α 2bK70N, respectivamente. Con el fin de confirmar que las diferencias observadas no eran dependientes de la línea celular utilizada para los ensayos *in vitro*, se evaluó la actividad antiproliferativa de dichas variantes sobre la línea celular MDBK. Los resultados confirmaron las divergencias encontradas entre ambos tipos de funciones biológicas de las mencionadas muteínas de rhIFN- α 2b, siendo la relación actividad antiviral/actividad antiproliferativa similar cuando se utilizó la misma línea celular (MDBK) para evaluar ambas actividades biológicas o líneas celulares diferentes (MDBK y Daudi) para su valorarlas en forma dissociada.

Jaitin y col. (2006) reportaron que la unión del rhIFN- α 2 a ifnar1 es sub-óptima y, de esta manera, construyeron una mutante de rhIFN- α 2 con una mayor afinidad a esta subunidad por mutación de los residuos His57, Glu58 y Gln61 por Ala. Esta variante demostró ser funcionalmente similar al IFN- β , con una mayor actividad antiproliferativa que el rhIFN- α 2 *wild type*, pero sin cambios notables en su actividad antiviral. En nuestra estrategia de glicoingeniería, la mutación del aminoácido Arg12 por Asn o la presencia de carbohidratos unidos a dicho residuo resultó en una molécula con una actividad específica antiproliferativa superior con respecto a la actividad antiviral. Esta última no se vio afectada por dicha sustitución, contrariamente a lo reportado por Piehler y col. (2000), motivo por el cual esta muteína había sido seleccionada como control en nuestros experimentos. Por lo expuesto anteriormente, es posible que esta mutación estabilice en forma directa o indirecta la interacción de la proteína con la subunidad ifnar1 del receptor, siendo responsable de la superior actividad antiproliferativa específica.

5.4. EVALUACIÓN DEL GRADO DE GLICOSILACIÓN DE LAS MUTEÍNAS DEL rhIFN- α 2b MEDIANTE ENSAYOS DE *WESTERN BLOT*

El grado de glicosilación de las muteínas del rhIFN- α 2b con un sitio potencial de *N*-glicosilación fue evaluado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y posterior ensayo de *Western blot* utilizando los sobrenadantes de cultivo obtenidos a partir de las tranfecciones transitorias. La reacción inmunoquímica se llevó a cabo incubando las muestras separadas

electroforéticamente con anticuerpos policlonales obtenidos en conejo, de manera de asegurar el reconocimiento de todas las variantes y sus glicofomas.

Tal como se esperaba, se encontró que las muteínas del rhIFN- α 2b con un sitio potencial de *N*-glicosilación se hallaban glicosiladas en diferentes proporciones (Fig. 32). En general, se observó la presencia de tres bandas claramente diferenciadas, con una masa molecular aparente comprendida en un rango entre 18 y 29 kDa según la variante analizada. Una de estas bandas correspondería a una fracción de la proteína no glicosilada, teniendo en cuenta que el peso molecular aparente por SDS-PAGE de la citoquina producida en *E. coli* es de aproximadamente 19 kDa (Goeddel y col., 1980). El peso molecular aparente de la banda en posición intermedia en el gel (aproximadamente 22 kDa), coincide con el de la proteína *O*-glicosilada (Allen, 1982; Adolf y col., 1991). La fracción restante correspondería a una mezcla de proteínas *N*-glicosiladas y *N,O*-glicosiladas, probablemente con diferentes estructuras de carbohidratos unidas al sitio consenso, lo cual se evidencia por la diferencia de la masa molecular máxima alcanzada para las distintas muteínas (variantes K70N y L95T en comparación con las restantes variantes).

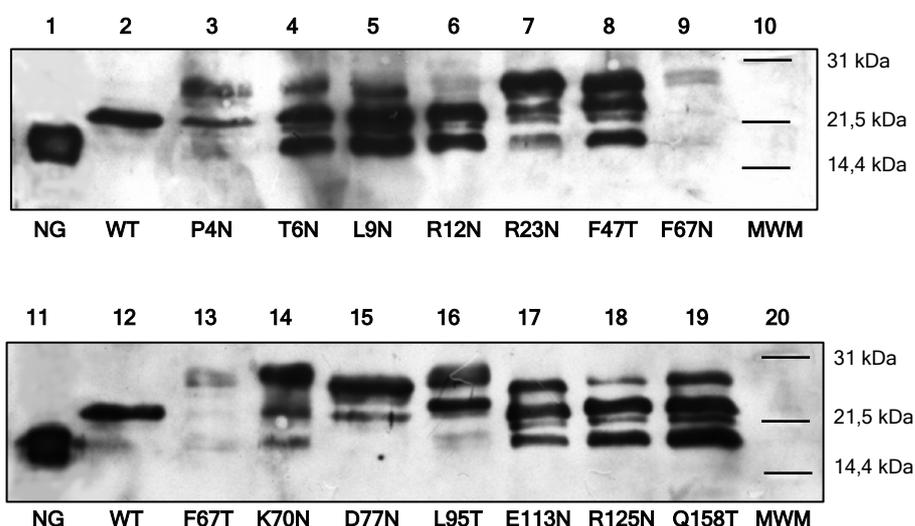


Fig. 32. Evaluación del grado de glicosilación de muteínas del rhIFN- α 2b con un sitio potencial de *N*-glicosilación.

Los sobrenadantes de cultivo conteniendo las muteínas del rhIFN- α 2b, obtenidos a partir de transfecciones transitorias, se analizaron mediante técnica de *Western blot*. En las calles 1 y 11 se sembraron 100 ng de estándar de rhIFN- α 2b no glicosilado (NG). En las calles 2 y 12 se sembró el sobrenadante conteniendo el rhIFN- α 2b *wild type* (WT). En las calles 10 y 20 se corrieron marcadores de masa molecular (MWM). En el resto de las calles se analizaron las muteínas del rhIFN- α 2b que se indican en la figura.

Para estimar la proporción de las isoformas presentes en las muestras, la cual fue diferente de acuerdo con la variante del rhIFN- α 2b analizada, se realizó una densitometría y una posterior valoración porcentual de las bandas empleando el *software* comercial ImageMaster TotalLab V1.11 (GE Healthcare).

En particular, se observó que el rhIFN- α 2b *wild type* se encontraba completamente *O*-glicosilado, sin presencia detectable de moléculas no glicosiladas. Los sobrenadantes de cultivo que contenían las variantes rhIFN- α 2bP4N y rhIFN- α 2bD77N tampoco mostraron la presencia de proteína no glicosilada, observándose sólo dos bandas en el ensayo de *Western*

blot. La muteína rhIFN- α 2bR12N, cuya actividad biológica antiproliferativa resultó superior con respecto a la de la citoquina nativa y a la del resto de las variantes, demostró un muy bajo contenido de moléculas con el sitio potencial de *N*-glicosilación ocupado (< 5%). Esto permite concluir que la diferencia de actividad observada se produciría principalmente por la sustitución del residuo Arg12 por Asn y no por la presencia de oligosacáridos unidos a dicho sitio. Con excepción del probable rol de este residuo en la interacción con el receptor (Piehler y col., 2000), el resto de los parámetros evaluados para predecir la eficiencia de glicosilación de este sitio habían resultado satisfactorios de acuerdo con los valores de corte establecidos, lo cual indica la existencia de ciertas limitaciones en el análisis teórico realizado. Sin embargo, en la mayoría de los casos se observó una elevada concordancia entre la selección y justificación teórica de los potenciales sitios de *N*-glicosilación con los hechos experimentales. Coincidiendo con las hipótesis realizadas previamente, las muteínas rhIFN- α 2bF67N y rhIFN- α 2bF67T se expresaron en muy baja concentración, si bien ambas se *N*-glicosilaron en una alta proporción (70% y 40%, respectivamente). Para confirmar la baja expresión de ambas variantes, producida probablemente por un control de calidad de la célula que evita su exportación, se repitió el experimento de transfección transitoria de células CHO con los plásmidos correspondientes. Los resultados confirmaron que, efectivamente, ambas proteínas presentan algún tipo de inconveniente en su proceso de secreción al sobrenadante de cultivo.

Las muteínas del rhIFN- α 2b que presentaron mayor eficiencia de *N*-glicosilación, calculada como el porcentaje de isoformas *N*-glicosiladas con respecto a las isoformas totales, fueron rhIFN- α 2bP4N, rhIFN- α 2bR23N, rhIFN- α 2bK70N, rhIFN- α 2bD77N (> 50%), rhIFN- α 2bL95T (\approx 40%) y rhIFN- α 2bF47T y rhIFN- α 2bE113N (\approx 30%). En general, se observó una tendencia a encontrar isoformas menos glicosiladas cuando los sitios consenso se aproximaban a ambos extremos de la proteína (rhIFN- α 2bT6N, rhIFN- α 2bL9N, rhIFN- α 2bR12N hacia el extremo *N*-terminal y rhIFN- α 2bR125N, rhIFN- α 2bQ158T, hacia el extremo *C*-terminal; constituyendo la variante rhIFN- α 2bP4N una excepción). Estos resultados coinciden con los encontrados para un gran número de glicoproteínas secretorias (Gavel y von Heijne, 1990). Por otro lado, las variantes rhIFN- α 2bK70N y rhIFN- α 2bL95T presentaron glicofomas *N*-glicosiladas de mayor masa molecular aparente que las correspondientes a las otras muteínas, indicando la presencia de diferentes estructuras glicosídicas unidas al residuo de Asn del tripéptido consenso.

Para confirmar que las bandas de mayor masa molecular observadas en el ensayo de *Western blot* correspondían al rhIFN- α 2b unido a oligosacáridos a través de enlaces de tipo N, se llevó a cabo una reacción de deglicosilación enzimática. Existen diversas enzimas disponibles para la liberación de oligosacáridos tipo N. Una de las más utilizadas es la péptido-N⁴-(N-acetil- β -glucosaminil)asparagina amidasa (PNGasa F), una amidohidrolasa purificada a partir de cultivos de *F. meningosepticum*, que hidroliza el enlace glicosilamina de una amplia variedad de sustratos glicoproteicos/glicopeptídicos. Se genera un residuo de Asp en el sitio de hidrólisis y se libera un 1-amino oligosacárido (Tarentino y col., 1985).

Todos los sobrenadantes de cultivo se trataron con PNGasa F en condiciones desnaturalizantes, ya que de esta manera disminuye la cantidad de enzima requerida para la remoción total de los carbohidratos. El ensayo de *Western blot* realizado luego de la digestión enzimática demostró la desaparición de las bandas de mayor masa molecular, las cuales se desplazaron hacia la región de las formas de la proteína no glicosilada y *O*-glicosilada, permitiendo confirmar la presencia de oligosacáridos unidos a través de uniones de tipo N (Fig. 33).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la caracterización preliminar de las muteínas con un sitio de *N*-glicosilación, se seleccionaron algunas representantes para continuar con su proceso de producción en células CHO, de manera de evaluar finalmente sus propiedades farmacocinéticas y compararlas con las correspondientes a la proteína *wild type*.

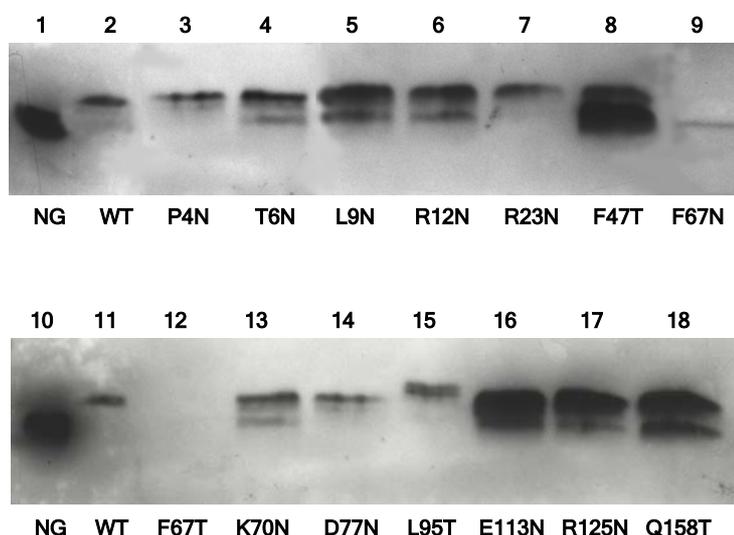


Fig. 33. Tratamiento de las muteínas del rhIFN- α 2b con un sitio de *N*-glicosilación con la enzima PNGasa F.

Los sobrenadantes de cultivo conteniendo las muteínas del rhIFN- α 2b, obtenidos a partir de transfecciones transitorias, fueron tratados con la enzima PNGasa F y analizados mediante técnica de *Western blot*. En las calles 1 y 10 se sembraron 100 ng de estándar de rhIFN- α 2b no glicosilado. En las calles 2 y 11 se sembró el sobrenadante conteniendo el rhIFN- α 2b *wild type* tratado con PNGasa F. En el resto de las calles se analizaron las muteínas *N*-deglicosiladas del rhIFN- α 2b que se indican en la figura.

La muteína rhIFN- α 2bD77N se ajustó a las características buscadas al aplicar la estrategia de glicoingeniería, ya que se encontró dentro de las proteínas con mayor eficiencia de *N*-glicosilación ($\approx 70\%$) y sin pérdida de actividad biológica, ya sea antiviral o antiproliferativa. Otra propiedad importante de esta muteína es que la misma fue reconocida por todos los mAbs evaluados en el ensayo de ELISA *sandwich* (con excepción del mAb CA9C3, que presentó inconvenientes en la interacción con la molécula *O*-glicosilada, lo que invalida su uso para la cuantificación de cualquiera de las variantes construidas). Este hecho constituye una ventaja operativa, ya que permite contar con diferentes ligandos de inmutafinidad para evaluar la purificación de la molécula mediante este tipo de cromatografía. Finalmente, este aminoácido suscitó un interés especial, debido a que constituye el residuo homólogo a la Asn80 del hIFN- β (Radhakrishnan y col., 1996) (Fig. 5, sección 3.2 del apartado Introducción), el cual se encuentra naturalmente *N*-glicosilado. Diversos autores han concluido que la porción glicosídica del hIFN- β mejora su estabilidad, solubilidad y, consecuentemente, su actividad biológica. De acuerdo con esto, se ha encontrado que el rhIFN- β no glicosilado producido en *E. coli* posee una actividad específica aproximadamente 10 veces menor que la de su contraparte glicosilada (Karpusas y col., 1998; Runkel y col., 1998b).

Por otro lado, la muteína rhIFN- α 2bP4N también cumplió con los requisitos buscados, con un alto grado de *N*-glicosilación (\approx 65%), conservación de la actividad biológica específica antiviral y antiproliferativa y reconocimiento por parte de los diferentes mAbs.

En virtud de estas características, ambas variantes del rhIFN- α 2b con un sitio de *N*-glicosilación fueron seleccionadas para continuar con la caracterización de sus propiedades farmacocinéticas.

6. PRODUCCIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FARMACOCINÉTICA DEL rhIFN- α 2b *WILD TYPE* Y DE LAS VARIANTES CON UN SITIO DE *N*-GLICOSILACIÓN rhIFN- α 2bP4N Y rhIFN- α 2bD77N

6.1. OBTENCIÓN DE CLONES ESTABLES DE CÉLULAS CHO.K1 PRODUCTORES DEL rhIFN- α 2b *WILD TYPE*, rhIFN- α 2bP4N Y rhIFN- α 2bD77N

Una mínima proporción de una población de células transfectadas con un vector de expresión incorpora la secuencia de ADN codificante para la proteína en estudio en su genoma celular. Mediante presión de selección con un antibiótico cuya resistencia esté codificada en el mismo plásmido se pueden aislar dichas células. Las líneas celulares estables constituyen una fuente permanente e ilimitada de la proteína recombinante de interés.

Con el fin de obtener clones celulares que expresen en forma estable el rhIFN- α 2b *wild type*, rhIFN- α 2bP4N y rhIFN- α 2bD77N, se realizaron transfecciones de células CHO.K1 con los plásmidos correspondientes, utilizando las mismas condiciones de lipofección que las empleadas para la expresión transitoria. Luego de 15 días de presión de selección con el antibiótico genecín, durante los cuales se realizaron recambios del medio de cultivo suplementado con dicho antibiótico y con SFB 5% (V/V) cada 48 o 72 h, se cosecharon las células de los pozos de las placas de cultivo mediante el tratamiento enzimático con tripsina y se realizó el clonado de las células resistentes por dilución límite. Teniendo en cuenta que las distintas líneas transfectadas pueden presentar diferencias a nivel de crecimiento, expresión y calidad del producto, este procedimiento tuvo como objetivo asegurar una estirpe celular que descienda de una única célula; es decir, que todas las células sean genéticamente idénticas.

Se cosechó el sobrenadante de los pozos de las placas de 96 cavidades donde se evidenció por observación microscópica el crecimiento de una única colonia y se realizó el *screening* de las diferentes variantes del rhIFN- α 2b mediante técnica de ELISA *sandwich*, empleando el mAb CA5E6. Los clones que mostraron mayor producción de las citoquinas fueron amplificados a placas de 24 pozos para evaluar su productividad celular en fase estacionaria. A pesar de que se aislaron numerosos clones resistentes al antibiótico, sólo se obtuvieron dos clones productores del rhIFN- α 2b *wild type*, cuatro clones productores del rhIFN- α 2bP4N y seis clones productores del rhIFN- α 2bD77N. Las productividades específicas de los clones aislados de cada variante del rhIFN- α 2b se estimaron utilizando la ecuación 9 (sección 15 del apartado Materiales y Métodos) (Tabla XVI).

Los valores de productividad oscilaron entre 4 y 70 ng. 10^6 cél $^{-1}$.día $^{-1}$, con una distribución típica en los niveles de expresión de los clones: muchos no expresaron el gen de interés o lo hicieron en cantidades no detectables por el sistema de detección, una amplia proporción presentó una productividad muy similar y un pequeño número de clones exhibió un nivel de expresión claramente superior al promedio. En general, la probabilidad de encontrar células altamente productoras depende del número de clones evaluados. Como en este caso se

encontraron pocos clones productores, los mejores niveles de expresión alcanzados sólo superaron a los valores promedio en 2 veces. Se ha reportado que los niveles de expresión alcanzados por clones “superproductores” estarían en el rango de 5 a 30 veces por encima del promedio del *pool* de clones (Wirth, 1997).

Tabla XVI. Productividades celulares específicas de los diferentes clones productores de las variantes del rhIFN- α 2b.

Variante	Clones	Productividad específica (ng. 10^6 cél $^{-1}$. día $^{-1}$)
rhIFN- α 2b <i>wild type</i>	wt1C5	8,1
	wt1F6	71,9
rhIFN- α 2bP4N	P4N1A6	8,1
	P4N2E5	7,1
	P4N2F8	28,7
	P4N2G5	4,3
rhIFN- α 2bD77N	D77N1A6	17,0
	D77N1C6	33,3
	D77N2B1	17,3
	D77N2D4	17,2
	D77N2E7	17,5
	D77N2G8	18,9

En negrita se remarcan los clones seleccionados de cada variante que presentaron mayor productividad celular.

Para la selección de un clon productor no sólo deben tenerse en cuenta sus niveles de expresión. La conservación de la actividad biológica específica y, en este caso, el grado de glicosilación constituyen parámetros de gran importancia. Al evaluar dichos parámetros se observó que todos los clones demostraron una actividad biológica específica comprendida dentro del rango esperado, no evidenciándose diferencias en el patrón de glicosilación ni en el número de isoformas, visualizadas mediante técnica de *Western blot* (resultados no mostrados).

Por lo tanto, en base a su productividad, se seleccionaron los clones wt1F6, P4N2F8 y D77N1C6 para llevar a cabo la producción de dichas variantes en una escala superior.

6.2. PRODUCCIÓN DEL rhIFN- α 2b *WILD TYPE*, rhIFN- α 2bP4N y rhIFN- α 2bD77N MEDIANTE EL CULTIVO DE LOS CLONES SELECCIONADOS EN CONDICIONES DE ADHERENCIA

Un cultivo de células *in vitro* puede ser manipulado mediante diferentes estrategias con el fin de optimizar el crecimiento o la formación del producto de interés. Por un lado, se pueden mejorar las líneas productoras (mediante selección, mutación o recombinación genética) y, por el otro, el proceso de producción (mediante la formulación de un medio de cultivo adecuado, la selección del sistema de cultivo y el diseño y control del proceso) (Katinger y Scheirer, 1985).

Con el fin de optimizar las condiciones de producción de los análogos del rhIFN- α 2b, se analizaron diferentes aspectos de los clones productores de la citoquina *wild type* y de las variantes con un sitio de *N*-glicosilación rhIFN- α 2bP4N y rhIFN- α 2bD77N.

La selección del modo de cultivo debe adaptarse a los requerimientos celulares y a sus características de crecimiento y de formación de producto, de manera de identificar el tiempo óptimo de cosecha del sobrenadante de cultivo donde se encuentra la proteína de interés. La cinética de formación de metabolitos puede estar relacionada o no con la velocidad de crecimiento, las fases del crecimiento celular o las etapas del ciclo celular. Muchas células son mejores productoras cuando se encuentran en un estado proliferativo, mientras que otras presentan una mayor capacidad de secreción del producto cuando están inactivas. Por ejemplo, la producción de mAbs a partir de hibridomas generalmente es independiente de la división celular, continuando su secreción durante la fase estacionaria y la fase de muerte celular. Mientras que en algunos casos la velocidad específica de producción es constante, en otros es mayor en la fase estacionaria que durante la fase exponencial del crecimiento (Wagner, 1997).

Para evaluar la producción de las variantes del rhIFN- α 2b en las diferentes fases del crecimiento celular, se determinó la productividad específica de todos los clones productores obtenidos en fase de crecimiento exponencial y estacionaria en medio de cultivo suplementado con SFB 5% (V/V) (Fig. 34). Para todos los clones analizados, la productividad específica fue superior en fase de crecimiento estacionaria, indicando que la producción no se encuentra asociada directamente a la proliferación celular, como ha sido reportado en la literatura para diversas líneas celulares, entre ellas líneas de células CHO recombinantes productoras de IFN- γ (Leelavatcharamas y col., 1994). Por otra parte, la valoración biológica antiviral de los sobrenadantes cosechados en ambas fases del crecimiento celular indicó que no existen variaciones en la calidad de las moléculas en términos de actividad biológica específica. Tampoco se encontraron diferencias en el patrón de glicosilación de las muestras en diferentes estadios del crecimiento, evaluado mediante ensayos de *Western blot*. De esta manera, se decidió realizar la producción en fase estacionaria del cultivo, cuando las células se encuentran formando una monocapa, de manera de obtener el máximo rendimiento. Además, esta estrategia de cultivo resulta práctica desde el punto de vista operativo en sistemas tipo *batch*, ya que permite crecer las células hasta que alcancen la confluencia y realizar recambios por medio de cultivo fresco en fase estacionaria, eludiendo la necesidad de llevar a cabo subcultivos en forma periódica para el sostenimiento de una fase de crecimiento exponencial.

Teniendo en cuenta que todos los clones analizados presentaron un comportamiento similar, se continuó la optimización de las condiciones de producción de las muteínas del rhIFN- α 2b utilizando los tres clones seleccionados en base a su productividad específica (wt1F6, P4N2F8 y D77N1C6).

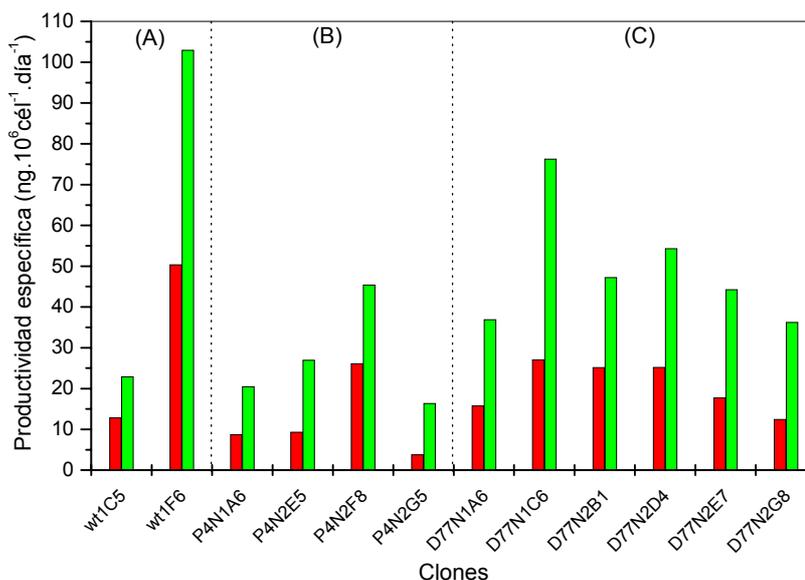


Fig. 34. Productividad específica de clones productores de variantes del rhIFN- α 2b en diferentes fases del crecimiento celular.

Se determinaron los valores de productividad específica en fase de crecimiento exponencial (■) y en fase de crecimiento estacionaria (■).

(A) Clones productores del rhIFN- α 2b *wild type*.

(B) Clones productores del rhIFN- α 2bP4N.

(C) Clones productores del rhIFN- α 2bD77N.

El suero fetal bovino es un suplemento universal de los medios de cultivo para células de mamífero, ya que permite el crecimiento de la mayoría de las líneas celulares, simplificando así la formulación del medio de cultivo. Sin embargo, presenta ciertas desventajas, entre las que se encuentran su composición indefinida, su alto costo, el hecho de constituir una fuente posible de contaminación con virus y micoplasmas y su interferencia en el *downstream processing*, entre otras. Por este motivo, desde el punto de vista tecnológico, la reducción o eliminación del contenido de suero del medio de cultivo resulta atractivo, ya que permite aumentar considerablemente la economía y la *performance* de un proceso de producción de proteínas recombinantes (Freshney, 2000d). Con el objeto de disminuir el contenido proteico de los sobrenadantes de cultivo y, de esta manera, reducir el costo de producción y facilitar la posterior purificación de las variantes del rhIFN- α 2b, se evaluó la productividad específica de los clones en presencia de concentraciones decrecientes de SFB en fase estacionaria de cultivo (Fig. 35). Pese a que el suero es una fuente importante de hormonas y factores de crecimiento, no se observaron diferencias en la densidad celular alcanzada por los cultivos de los tres clones cuando se redujo el contenido de SFB desde un 5% (V/V) hasta un 1% (V/V). Este resultado es razonable, considerando que los cultivos se encontraban en fase estacionaria cuando se realizó la sustitución del medio de cultivo. Tampoco se observó un descenso en la viabilidad de los cultivos. Sin embargo, en general, se observó una drástica caída de la productividad específica cuando se realizó este cambio en la composición del medio de cultivo. No ocurrió lo mismo cuando el contenido de suero se redujo desde un 1% (V/V) hasta un 0,5% (V/V) y 0,1% (V/V), donde las productividades específicas disminuyeron levemente dentro de dicho rango. No obstante, tanto la concentración celular como la viabilidad del cultivo disminuyeron notablemente cuando los clones se cultivaron en presencia de SFB 0,1% (V/V). Además, se visualizó el

desprendimiento de las células del soporte, probablemente debido a la reducción del contenido de factores de adhesión presentes en este suplemento. En todas las experiencias realizadas se verificó la conservación de la calidad de las proteínas producidas. Por todo lo expuesto, se seleccionó trabajar a una concentración de SFB del 0,5% (V/V), ya que si bien la productividad disminuye con respecto a la obtenida con una concentración de SFB del 5% (V/V), es muy similar a la obtenida con el resto de las concentraciones evaluadas, permitiendo disminuir diez veces el contenido proteico de las muestras. Además, utilizando esta concentración de SFB se obtiene una alta densidad celular y viabilidad, lo que resulta en una adecuada producción de la proteína recombinante para las experiencias siguientes.

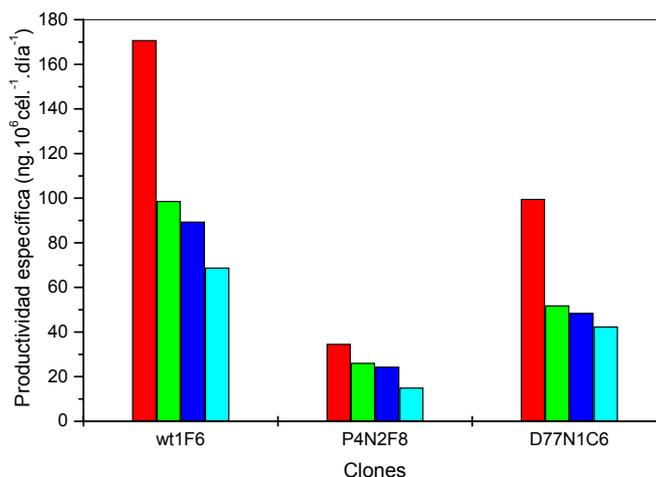


Fig. 35. Productividad específica de los clones wt1F6, P4N2F8 y D77N1C6 en presencia de diferentes concentraciones de SFB.

Se determinó la productividad específica de los tres clones en fase estacionaria de crecimiento, utilizando medio A suplementado con SFB 5% (V/V) (■), 1% (V/V) (■), 0,5% (V/V) (■) y 0,1% (V/V) (■).

Con el objeto de optimizar la producción de las diferentes variantes en una escala superior, se seleccionó el clon rhIFN- α 2bD77N1C6 para determinar el intervalo de tiempo óptimo entre recambios de medio de cultivo durante la fase estacionaria del crecimiento celular. Se realizaron ocho cosechas y sus correspondientes recambios de medio de cultivo cada 24 h y cuatro cosechas cada 48 h en cultivos en fase estacionaria, utilizando medio A suplementado con SFB 0,5% (V/V). Se determinó la concentración del rhIFN- α 2bD77N en los sobrenadantes de cultivo y se evaluó la densidad y viabilidad celular. Posteriormente, se calculó la productividad específica y la producción acumulada del rhIFN- α 2bD77N (Fig. 36). Para ambos intervalos de tiempo se obtuvieron valores de productividad específica similares, observándose una disminución de los mismos a medida que transcurría el tiempo de cultivo. Estos resultados indican que la producción no puede realizarse en forma indefinida a lo largo del tiempo, ya que el envejecimiento del cultivo resulta en una disminución de la síntesis de la proteína recombinante por las células. Dado que, en ambos casos, la viabilidad se mantiene alta durante todo el cultivo, es posible que, a medida que transcurre el tiempo, la maquinaria celular comience a utilizar más energía para el mantenimiento celular y no para la biosíntesis. Se ha sugerido que hasta un 60% de la energía provista en los medios de cultivo pueden destinarse únicamente para el mantenimiento de la integridad metabólica y estructural de la célula (Kilburn y col., 1969; Wagner, 1997). Por otra parte, la masa total acumulada del rhIFN- α 2bD77N cuando se realizaron

ocho cosechas cada 24 h (277 ng) fue similar a la obtenida cuando se realizaron cuatro cosechas cada 48 h (252 ng). En consecuencia, se obtuvieron concentraciones más altas del rhIFN- α 2bD77N en los sobrenadantes cosechados cada 48 h. Este último intervalo de tiempo resulta conveniente porque, por un lado, favorece la purificación de la citoquina, debido a que la proporción de la misma con respecto a los contaminantes es mayor en comparación con las cosechas efectuadas cada 24 h y, además, el tiempo del proceso se reduce a causa del menor volumen de trabajo. Por otra parte, el costo de producción disminuye, ya que se utiliza menos volumen de medio de cultivo con el mismo rendimiento. En ambas experiencias, se evaluó la calidad de la molécula producida, la cual conservó su actividad biológica específica y su perfil de glicofomas de masa molecular durante todo el cultivo. Este resultado se correlaciona con el mantenimiento de la viabilidad celular, que impide que las proteasas y glicosidasas intracelulares se liberen al medio, manteniendo la integridad del producto secretado.

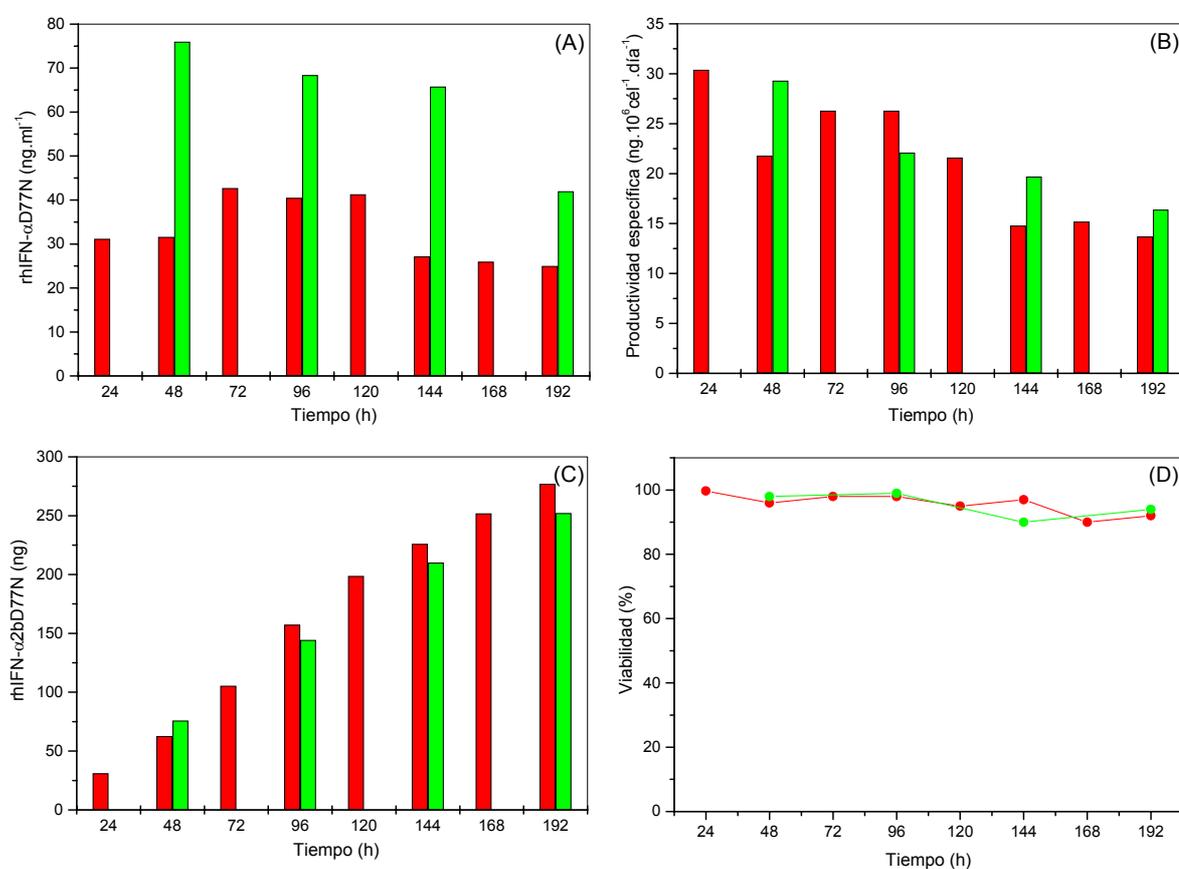


Fig. 36. Optimización del tiempo de cosecha de los sobrenadantes de cultivo durante la producción del rhIFN- α 2bD77N.

Se determinó la concentración (A), la productividad específica (B) y la masa acumulada del rhIFN- α 2bD77N (C) en los sobrenadantes obtenidos mediante el cultivo del clon D77N1C6, y la viabilidad del cultivo (D). Tiempos de cosecha: 24 h (■) y 48 h (■).

La producción de las diferentes variantes del rhIFN- α 2b se realizó en frascos T triples de 500 cm² de superficie, utilizando cultivos en fase estacionaria de crecimiento y realizando recambios cada 48 h con medio de cultivo fresco suplementado con SFB 0,5% (V/V). En esta escala de trabajo, la concentración de las variantes producidas por los clones rhIFN- α 2bwt1F6 y

rhIFN- α 2bD77N1C6 en los sobrenadantes de cultivo fue considerablemente mayor con respecto a la obtenida en pequeña escala (valores entre 130 ng.ml⁻¹ y 250 ng.ml⁻¹ para el rhIFN- α 2b *wild type* y entre 85 ng.ml⁻¹ y 370 ng.ml⁻¹ para el rhIFN- α 2bD77N). Este hecho puede deberse a una mayor densidad celular del cultivo (la cual no pudo determinarse mediante recuento celular dado el sistema de cultivo utilizado), ya que se observó la formación de pequeños cúmulos de células que crecían en dirección vertical, independizándose de la superficie del sustrato disponible para continuar con su crecimiento (Fig. 37). El clon productor de la variante rhIFN- α 2bP4N evidenció el mismo tipo de crecimiento pero no demostró una elevada producción de la citoquina, obteniéndose concentraciones entre 5 ng.ml⁻¹ y 20 ng.ml⁻¹ en los sobrenadantes de cultivo. Estos valores fueron similares o incluso menores a los obtenidos en pequeña escala. Por este motivo, no se llevó a cabo la purificación de dicha proteína a partir de los sobrenadantes obtenidos mediante el cultivo de este clon, y se seleccionó el clon rhIFN- α 2bD77N1C6 como representante de las variantes de rhIFN- α 2b con un sitio de *N*-glicosilación para los posteriores experimentos.

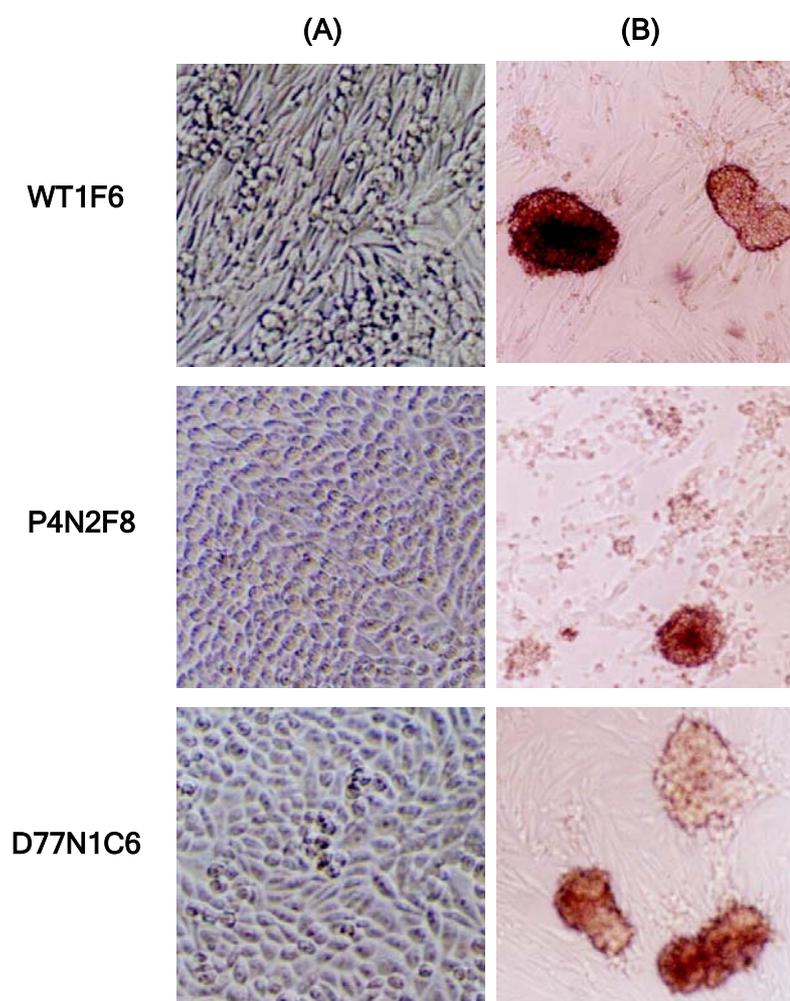


Fig. 37. Producción de rhIFN- α 2b*wild type*, rhIFN- α 2bP4N y rhIFN- α 2bD77N en condiciones de adherencia.

Los clones productores de las diferentes variantes del rhIFN- α 2b se cultivaron hasta confluencia (A) empleando medio A suplementado con SFB 5% (V/V). Posteriormente, se realizaron recambios cada 48 h con medio de cultivo A suplementado con SFB 0,5% (V/V), observándose la formación de cúmulos de células a medida que transcurrió el tiempo de cultivo (B).

6.3. PURIFICACIÓN DEL rhIFN- α 2b *WILD TYPE* Y rhIFN- α 2bD77N MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE INMUNOAFINIDAD

El establecimiento de un protocolo adecuado para la purificación de un analito implica obtenerlo con un elevado grado de pureza utilizando un número reducido de etapas de manera de minimizar la pérdida de material. Esto cobra mayor importancia cuando la proteína de interés se produce a partir de un cultivo de células de mamífero, ya que, en general, suelen alcanzarse bajos niveles de expresión y se trabaja con medios de cultivo suplementados con suero fetal bovino, lo que introduce un gran número de contaminantes.

La cromatografía de afinidad, introducida en 1968 por Cuatrecasas y col., constituye una de las herramientas más poderosas para el aislamiento de proteínas, ya que permite obtener un alto grado de purificación en un único paso, con valores de recuperación de hasta un 90%. Esta cromatografía explota una característica biológica altamente específica, el reconocimiento molecular o biorreconocimiento, para la purificación selectiva de la molécula de interés (Sofer y Hagel, 2001). Uno de los ligandos utilizados por excelencia son los anticuerpos, cuya inmovilización a un soporte genera una matriz inmunoabsorbente, constituyendo la denominada cromatografía de afinidad. Esta técnica consiste en tres etapas básicas:

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

Existen diversos factores que contribuyen al éxito de la purificación por afinidad. Uno de ellos es la pureza inicial del antígeno, ya que aunque esta cromatografía provee un alto grado de purificación en un solo paso, si la muestra de partida es muy compleja será necesario adicionar otros pasos de purificación. La afinidad del anticuerpo hacia el antígeno es el factor determinante de la cantidad de antígeno que podrá ser captado de la solución en un cierto período de tiempo. Aún cuando el anticuerpo se encuentre en una alta concentración, si su afinidad por el antígeno es baja no será capaz de retener todo el antígeno presente en la solución. Por último, el éxito del proceso está influenciado por la facilidad con la cual el antígeno pueda ser eluido de la matriz. Esto se encuentra determinado únicamente por el tipo y número de enlaces establecidos en la formación del complejo y, por lo tanto, se encuentra relacionado con la afinidad. Sin embargo, la afinidad no determina por sí misma la capacidad de elución del antígeno. El anticuerpo ideal para una purificación por afinidad es aquél que posea una alta afinidad por el antígeno y cuya unión pueda ser revertida mediante un cambio suave y sencillo de una variable simple de manejar, como por ejemplo el pH (Harlow y Lane, 1988b).

Se evaluaron tres mAbs anti-rhIFN- α 2b (CA1A3, CA5E6 y CB15D7) como ligandos de matrices de afinidad para la purificación de la proteína rhIFN- α 2bD77N. La selección se realizó teniendo en cuenta su capacidad para reconocer a la mayoría de las variantes glicosiladas de la citoquina y su elevada constante de afinidad hacia la molécula no glicosilada (Tabla II, sección 2 de Materiales y Métodos).

6.3.1. PREPARACIÓN DE MATRICES DE INMUNOAFINIDAD

6.3.1.1. PRODUCCIÓN DE MABS *IN VIVO* EN LÍQUIDO ASCÍTICO

La obtención de los anticuerpos para su inmovilización en matrices de inmutofinidad se realizó mediante producción *in vivo* en líquido ascítico. La determinación de la concentración de Igs en la ascitis fue efectuada mediante técnica de ELISA *sandwich*. Este ensayo pone en evidencia todos los anticuerpos presentes en el fluido biológico: monoclonales producidos a partir del tumor de los hibridomas y policlonales propios del ratón. A pesar de ello, por medio de esta metodología es posible calcular con bastante aproximación la concentración de mAbs debido a que en una ascitis murina más del 90% de las Igs son de naturaleza monoclonal, producidas por los hibridomas. La mayor concentración acumulada de mAb se obtuvo en el líquido ascítico obtenido a partir de los hibridomas CA5E6 y CB15D7 (10,65 mg.ml⁻¹ y 23,10 mg.ml⁻¹, respectivamente). Estos valores son superiores a los descritos en bibliografía (Butler, 1988). Por otra parte, se obtuvo una menor concentración de mAb CA1A3 (2,30 mg.ml⁻¹).

6.3.1.2. PURIFICACIÓN DE LOS MABS POR CROMATOGRFÍA DE AFINIDAD A PROTEÍNA A

Los mAbs presentes en las ascitis murinas fueron purificados por cromatografía de afinidad a proteína A. La Fig. 38 muestra los cromatogramas obtenidos durante la purificación de los mismos, la cual fue monitoreada por espectrofotometría a $\lambda=280$ nm.

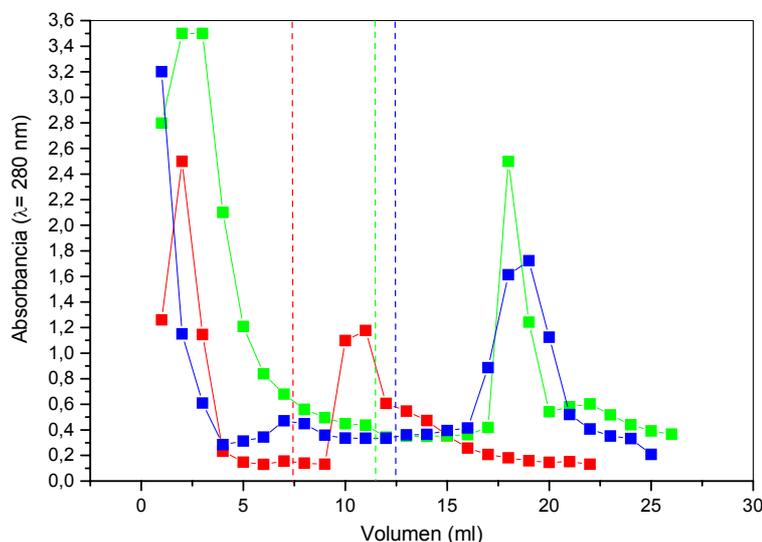


Fig. 38. Purificación de los mAbs anti-rhIFN- α 2b mediante cromatografía de afinidad a proteína A.

Se graficaron los valores de absorbancia a $\lambda=280$ nm, correspondientes a cada fracción recolectada, en el eje de ordenadas, en función del volumen, en el eje de abscisas. Las líneas cortadas dividen los cromatogramas en dos sectores: por un lado, las fracciones correspondientes a la siembra y a los lavados y, por el otro, las fracciones correspondientes a la elución en la que se recuperan los anticuerpos.

mAbs: CA1A3 (■), CA5E6 (■), CB15D7 (■).

Posteriormente, se determinó la concentración de Igs presentes en el *flowthrough*, los lavados y la elución mediante técnica de ELISA *sandwich*. La Tabla XVII resume los rendimientos obtenidos durante el proceso de purificación por afinidad de los tres mAbs, los cuales se calcularon utilizando la ecuación 12 (sección 17.3 del apartado Materiales y Métodos). Se observó una recuperación variable, que osciló entre 28,1% y 57,4% en la situación más favorable. En el único caso donde se evidenció pérdida de anticuerpo fue durante la etapa de lavado de la purificación del mAb CA5E6. En el resto de las purificaciones, las bajas recuperaciones podrían deberse a la retención de los mAbs en la matriz debido a condiciones de elución insuficientes para lograr la remoción cuantitativa de los mismos. Sin embargo, dada la alta concentración de anticuerpos en el material de partida, se obtuvo una masa adecuada de todos los mAbs para su inmovilización en matrices de inmutofinidad. Las fracciones correspondientes al pico de elución de los anticuerpos fueron mezcladas y dializadas contra solución de NaCl 0,5 M en NaHCO₃ 0,1 M, pH 8,3, con el objeto de acondicionar los anticuerpos para su posterior acoplamiento.

Tabla XVII. Rendimiento de la purificación de los mAbs anti-rhIFN- α 2b mediante cromatografía de afinidad a proteína A.

mAb	Muestra	Concentración (mg.ml ⁻¹)	Volumen (ml)	Masa (mg)	Recuperación (%)	
CA1A3	Ascitis	2,30	3,0	6,90	-	
	Elución	(F3-F4) ⁺	0,62	3,0	3,96	57,4
		(F5-F8) ⁺	0,35	6,0		
CA5E6	Ascitis	10,65	1,0	10,65	-	
	Elución	(F7-F8)	1,67	3,2	5,34	50,1
CB15D7	Ascitis	23,10	1,0	23,10	-	
	Elución	(F5-F8)	1,10	5,9	6,49	28,1

⁺El pico de elución correspondiente a la purificación del mAb CA1A3 se dividió en dos partes: por un lado, se mezclaron las fracciones 3 y 4 (numeradas desde el inicio del proceso de elución) y, por otro lado, las fracciones 5, 6, 7 y 8, las cuales corresponden a la cola del pico, para evitar la dilución del mAb.

La eficiencia de purificación, evaluada de acuerdo con el grado de pureza de los mAbs obtenidos a partir de los diferentes fluidos ascíticos, fue analizada mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y posterior tinción con azul brillante de Coomassie (Fig. 39).

En todos los casos se visualizaron dos bandas, correspondientes a las cadenas pesadas (\approx 50 kDa) y livianas (\approx 25 kDa) de las Igs, observándose la presencia de escasos contaminantes típicos de un líquido ascítico murino, mayoritariamente albúmina. El grado de pureza obtenido se consideró adecuado para la utilización de dichos anticuerpos como ligandos de captura de una cromatografía de inmutofinidad.

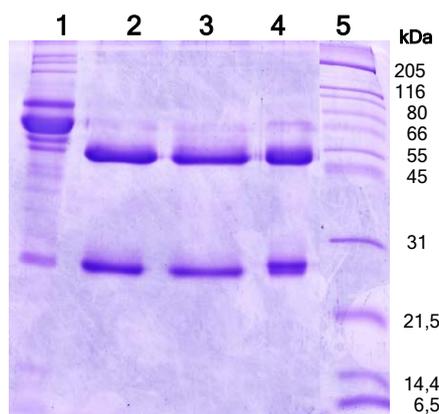


Fig. 39. Evaluación de la pureza de los mAbs anti-rhIFN- α 2b purificados a partir de ascitis murina mediante cromatografía de afinidad a proteína A.

Las fracciones correspondientes a los picos de elución de cada mAb se mezclaron, se dializaron y se analizaron mediante técnica de SDS-PAGE en condiciones reductoras con posterior tinción con azul brillante de Coomassie.

Calles: 1: Ascitis murina obtenida a partir del hibridoma CA1A3.
 2: Fracción correspondiente al pico de elución del mAb CA1A3.
 3: Fracción correspondiente al pico de elución del mAb CA5E6.
 4: Fracción correspondiente al pico de elución del mAb CB15D7.
 5: Marcadores de masa molecular.

6.3.1.3. ACOPLAMIENTO DE LOS LIGANDOS DE AFINIDAD A UNA MATRIZ DE *SEPHAROSE* ACTIVADA CON BROMURO DE CIANÓGENO

Los mAbs purificados fueron acoplados a 2 ml de una matriz de *Sepharose* activada con bromuro de cianógeno. El porcentaje de acoplamiento de los anticuerpos a la resina se calculó por medida de la concentración de Igs en la solución antes y después de la reacción de inmovilización. Como se observa en la Tabla XVIII, en todos los casos los porcentajes de acoplamiento fueron óptimos, superando el 97%.

Tabla XVIII. Determinación del porcentaje de acoplamiento de los mAbs anti-rhIFN- α 2b a una matriz de *Sepharose* activada con bromuro de cianógeno.

mAb	Masa aportada (mg)	Masa sin acoplar (mg)	Porcentaje de unión (%)	Densidad de ligando (mg mAb.ml gel ⁻¹)
CA1A3	1,57	0,04	97,5	0,77
CA5E6	2,70	0,04	98,5	1,33
CB15D7	1,65	0,03	98,2	0,83

Si se considera que cada molécula de Ig (PM \approx 150 kDa) inmovilizada en el soporte es apta para ligar una molécula de rhIFN- α 2b, es posible calcular la capacidad de unión teórica de cada resina mAb anti-rhIFN- α 2b-*Sepharose*, en base a la masa de anticuerpo inmovilizado. De esta manera, se pueden determinar los moles de mAb acoplado, los cuales coinciden con los moles de rhIFN- α 2b que dicha matriz sería capaz de captar en condiciones teóricas. Las capacidades teóricas calculadas resultaron ser de 5,1 nmol (CA1A3-*Sepharose*), 8,9 nmol (CA5E6-*Sepharose*) y 5,4 nmol (CB15D7-*Sepharose*) de variantes del rhIFN- α 2b por ml de gel.

Teniendo en cuenta que la masa molecular promedio de las variantes del rhIFN- α 2b es diferente de acuerdo con el tipo y grado de glicosilación, dicha capacidad teórica puede ser expresada en términos de masa de rhIFN- α 2b no glicosilado (PM \approx 19 kDa). Las capacidades teóricas así calculadas para cada matriz fueron de 96,9 μ g (CA1A3-*Sepharose*), 169,1 μ g (CA5E6-*Sepharose*) y 102,6 μ g (CB15D7-*Sepharose*) de rhIFN- α 2b por ml de gel. Sin embargo, se encuentra reportado que las capacidades reales suelen ser del orden del 40% de las capacidades teóricas, para columnas con densidades de ligando de 2-3 mg por ml de gel, probablemente debido a un acoplamiento diferencial del mAb a través de su porción F(ab), causado, por ejemplo, por la riqueza de lisinas en esa región de la molécula (Coligan y col., 1996).

6.3.2. OPTIMIZACIÓN DE LA PURIFICACIÓN DEL rhIFN- α 2bD77N POR CROMATOGRAFÍA DE INMUNOAFINIDAD

6.3.2.1. EVALUACIÓN DE LA *PERFORMANCE* DE LOS MABS COMO LIGANDOS DE AFINIDAD

La *performance* de las matrices cromatográficas fue evaluada mediante el estudio de la purificación de la muteína rhIFN- α 2bD77N. Se sembraron 30 ml de sobrenadante de cultivo obtenido mediante el cultivo del clon D77N1C6 (sección 6.2), verificando no exceder la capacidad teórica de ninguna de las resinas mAb-*Sepharose*. En todas las experiencias se sembraron masas del rhIFN- α 2bD77N que oscilaron entre 1,7 y 3,3% de las capacidades teóricas, es decir inferiores al 40% que representaría la capacidad real. La presencia del rhIFN- α 2bD77N en todas las fracciones fue evaluada mediante técnica de ELISA *sandwich* empleando el mAb CA5E6.

En la Fig. 40 se muestran los perfiles cromatográficos de la purificación de la citoquina. Confirmando los resultados obtenidos previamente mediante ensayos de ELISA *sandwich*, todos los mAbs fueron capaces de reconocer y captar a la muteína rhIFN- α 2bD77N presente en la muestra sembrada, lo que determinó que no se registrasen pérdidas de la misma en el *flowthrough* en ninguna de las experiencias. Sin embargo, en todos los casos se observó, en mayor o en menor medida, una pérdida de la citoquina en los lavados 2 y 3. Por otra parte, se obtuvieron picos de elución importantes para las matrices CA1A3- y CA5E6-*Sepharose*, mientras que la presencia de la citoquina se evidenció en una única fracción de la elución correspondiente a la matriz CB15D7-*Sepharose*.

Para estimar la recuperación del rhIFN- α 2bD77N sembrado en las diferentes resinas cromatográficas, se mezclaron las fracciones correspondientes a cada etapa del proceso de purificación (*flowthrough*, lavado 1, lavado 2, lavado 3 y elución) y se cuantificó el rhIFN- α 2bD77N presente en las mismas mediante técnica de ELISA *sandwich*, empleando el mAb CA5E6. En la Tabla XIX se resumen los resultados obtenidos para cada matriz.

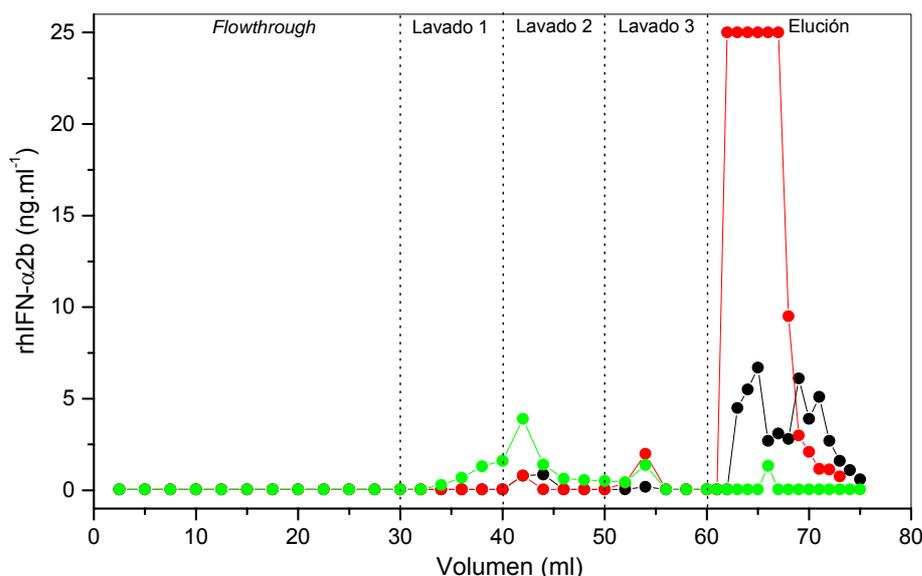


Fig. 40. Purificación del rhIFN- α 2bD77N mediante cromatografía de inmunoafinidad empleando diferentes mAbs.

Se graficaron los valores de concentración del rhIFN- α 2bD77N en cada fracción recolectada, obtenidos mediante ensayo de ELISA *sandwich*, en el eje de ordenadas, en función del volumen, en el eje de abscisas. Las líneas cortadas dividen los cromatogramas en las diferentes etapas del proceso cromatográfico: *flowthrough*, lavado 1, lavado 2, lavado 3 y elución. mAbs: CA1A3 (●), CA5E6 (●), CB15D7 (●).

La purificación empleando la resina CA1A3-*Sepharose* proporcionó una muy baja recuperación del rhIFN- α 2bD77N en la elución (2,5%), observándose una pérdida en el lavado 2, que, si bien fue poco significativa (4,1%), superó la masa obtenida durante el proceso de elución. Este resultado no concuerda con lo que indica el análisis del perfil cromatográfico, lo que puede explicarse teniendo en cuenta que durante el análisis del contenido de rhIFN- α 2bD77N en cada fracción se subestimó la concentración de citoquina presente en las correspondientes al lavado 2, debido a la interferencia de la solución de NaSCN 1 M sobre el reconocimiento inmunológico. Este efecto desapareció cuando durante el análisis de la recuperación se realizaron sucesivas diluciones del *pool* correspondiente a dicha etapa en BSA 0,1% (P/V) en PBS-Tween 20 0,05% (V/V) para la cuantificación del rhIFN- α 2bD77N frente a una curva estándar. Por otra parte, se obtuvo un pico de elución ancho, lo que indica que el cambio de pH produjo un desprendimiento lento de la citoquina de la matriz, obteniéndose bajas concentraciones de la misma en todas las fracciones y, por lo tanto, una baja recuperación. Además, la sumatoria de las recuperaciones obtenidas en el proceso global fue sólo de un 7,5%, demostrando que la mayor parte de la muestra sembrada quedó retenida en la matriz. Este hecho se puede atribuir a la alta constante de afinidad del mAb CA1A3 hacia el rhIFN- α 2b no glicosilado ($1,4 \cdot 10^{10} \pm 0,1 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$), la cual se conservaría elevada para la variante rhIFN- α 2bD77N, dificultando su elución.

Tabla XIX. Cálculo de la recuperación (R) del rhIFN- α 2bD77N purificado mediante el empleo de diferentes matrices de inmunoafinidad.

Resina mAb- <i>Sepharose</i>	Etapa	Concentración (ng.ml ⁻¹)	Volumen (ml)	Masa (ng)	R (%)
CA1A3	Siembra	156,7	30	4.701,0	-
	<i>Flowthrough</i>	-	30	-	-
	Lavado 1	-	10	-	-
	Lavado 2	19,5	10	195,0	4,1
	Lavado 3	4,2	10	42,0	0,9
	Elución	7,7	15	115,5	2,5
CA5E6	Siembra	368,0	30	11.040,0	-
	<i>Flowthrough</i>	0,2	30	6,0	5,0.10 ⁻²
	Lavado 1	-	10	-	-
	Lavado 2	26,0	10	260,0	2,4
	Lavado 3	8,0	10	80,0	0,7
	Elución	403,5	15	6.052,5	54,8
CB15D7	Siembra	114,8	30	3.444,0	-
	<i>Flowthrough</i>	-	30	-	-
	Lavado 1	1,1	10	11,0	0,3
	Lavado 2	261,3	10	2.613,0	75,9
	Lavado 3	23,0	10	230,0	6,7
	Elución	0,2	15	3,0	8,7.10 ⁻²

Al emplear la resina CB15D7-*Sepharose* se recuperó en un 75,9% de la muteína en el lavado 2, con una pérdida adicional en el resto de los lavados. Prácticamente no se observó la desorción de la misma durante la etapa de elución (8,7.10⁻²%). Es posible que la interacción que se establece en la formación del complejo mAb-rhIFN- α 2bD77N sea revertida mediante el empleo de un agente caotrópico como el NaSCN. Sin embargo, el uso de una estrategia basada en el empleo de NaSCN para realizar la desorción de la citoquina debería contemplar que los contaminantes no se desprendan en forma conjunta con la molécula de interés. Además, la labilidad intrínseca del anticuerpo frente a la acción de agentes caotrópicos puede resultar en una drástica caída de la capacidad de la matriz de inmunoafinidad, disminuyendo su vida útil o impidiendo su reutilización.

A diferencia de las matrices antes mencionadas, el mAb CA5E6 resultó un ligando apropiado para la purificación del rhIFN- α 2bD77N. Este mAb proporcionó una moderada recuperación en la elución (54,8%), con pérdidas mínimas de la citoquina en el *flowthrough* o en los lavados. Teniendo en cuenta que la afinidad de este anticuerpo por la molécula no glicosilada ($2,2 \cdot 10^8 \pm 0,1 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$) no es tan elevada como la hallada para el mAb CA1A3, es factible mejorar la desorción de la proteína de la matriz mediante una optimización de las condiciones de elución.

Dado que en ninguna de las resinas se produjo la elución completa de la citoquina, se realizó una regeneración de las mismas utilizando un agente disociante (cloruro de guanidina 0,3 M en Tris 25 mM, pH 7). Este tratamiento recuperó un 28,8% del rhIFN- α 2bD77N aplicado a la matriz CA1A3-*Sepharose* y un 8,1% de la proteína sembrada en la matriz CB15D7-*Sepharose*,

sin provocar la elución de la citoquina remanente en la resina CA5E6-*Sepharose*. Los bajos rendimientos obtenidos excluyeron esta metodología como posible estrategia de elución. Por otra parte, la determinación de Igs por técnica de ELISA en las diferentes etapas de la purificación evidenció una pérdida de ligando durante el tratamiento con cloruro de guanidina. Este resultado impidió la utilización de esta solución para la sanitización de las matrices, debido a la pérdida de capacidad que esto implicaría. En el resto de las fracciones no se observó pérdida de anticuerpo.

La eficiencia de purificación se evaluó mediante técnica de SDS-PAGE en condiciones reductoras con posterior tinción argéntica (Fig. 41A). Se observó que la mayoría de las proteínas contaminantes permanecieron en la fracción correspondiente al *flowthrough*, indicando una baja adsorción inespecífica a las matrices de inmutofinidad. El lavado 1 demostró utilidad para continuar con la remoción de los contaminantes. Contrariamente, la solución utilizada para el lavado 2 no contribuyó en gran medida a la eliminación de los contaminantes sino que, por el contrario, produjo una desorción de la citoquina en las tres matrices analizadas. Por este motivo, se suprimió dicho lavado para los siguientes protocolos de purificación. El lavado 3, de baja fuerza iónica, se empleó como *buffer* pre-elución.

Una de las características que debe reunir un mAb para ser utilizado como ligando de afinidad en una cromatografía para purificar glicoproteínas es reconocer todas las isoformas de la proteína de interés con idéntica afinidad. Para analizar esta característica, paralelamente todas las fracciones de la purificación se analizaron mediante ensayos de *Western blot* (Fig. 41B). Se comprobó que, utilizando el mAb CA5E6, la distribución de glicofomas de la citoquina en la muestra cruda fue muy similar a la correspondiente a la muteína recuperada en la elución.

Con el propósito de evaluar la *performance* de la matriz CA5E6-*Sepharose*, se determinó la concentración de proteínas totales mediante el método de Bradford y la concentración de la citoquina por técnica de ELISA *sandwich* en la muestra cruda empleada para la purificación y en la elución, previamente diafiltrada y concentrada. A partir de estos datos, se calcularon parámetros de purificación (Tabla XX). El factor de purificación fue muy satisfactorio, ya que se encuadró perfectamente dentro de los rangos habituales reportados en la bibliografía (Harlow y Lane, 1988b). Por otro lado, mediante densitometría de bandas a partir de un gel de SDS-PAGE se determinó un grado de pureza del 85% de dicha variante, resultando apropiada para un único paso de purificación. Finalmente, se analizó la actividad biológica específica de la citoquina obtenida luego del proceso de elución, la cual resultó similar a la presente en la muestra de partida del proceso de purificación, indicando que las condiciones eluyentes no alteraron la estructura de la proteína.

Tabla XX. Parámetros de purificación del rhIFN- α 2bD77N utilizando la matriz de inmutofinidad CA5E6-*Sepharose*.

Muestra	rhIFN- α 2bD77N ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Proteínas totales ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	Actividad específica (A.E.)	Factor de purificación (F.P.)	Rendimiento (%)
Sobrenadante de cultivo	0,37	780,00	$4,70\cdot 10^{-4}$	-	-
Elución	7,20	11,80	0,61	1.298	54,8

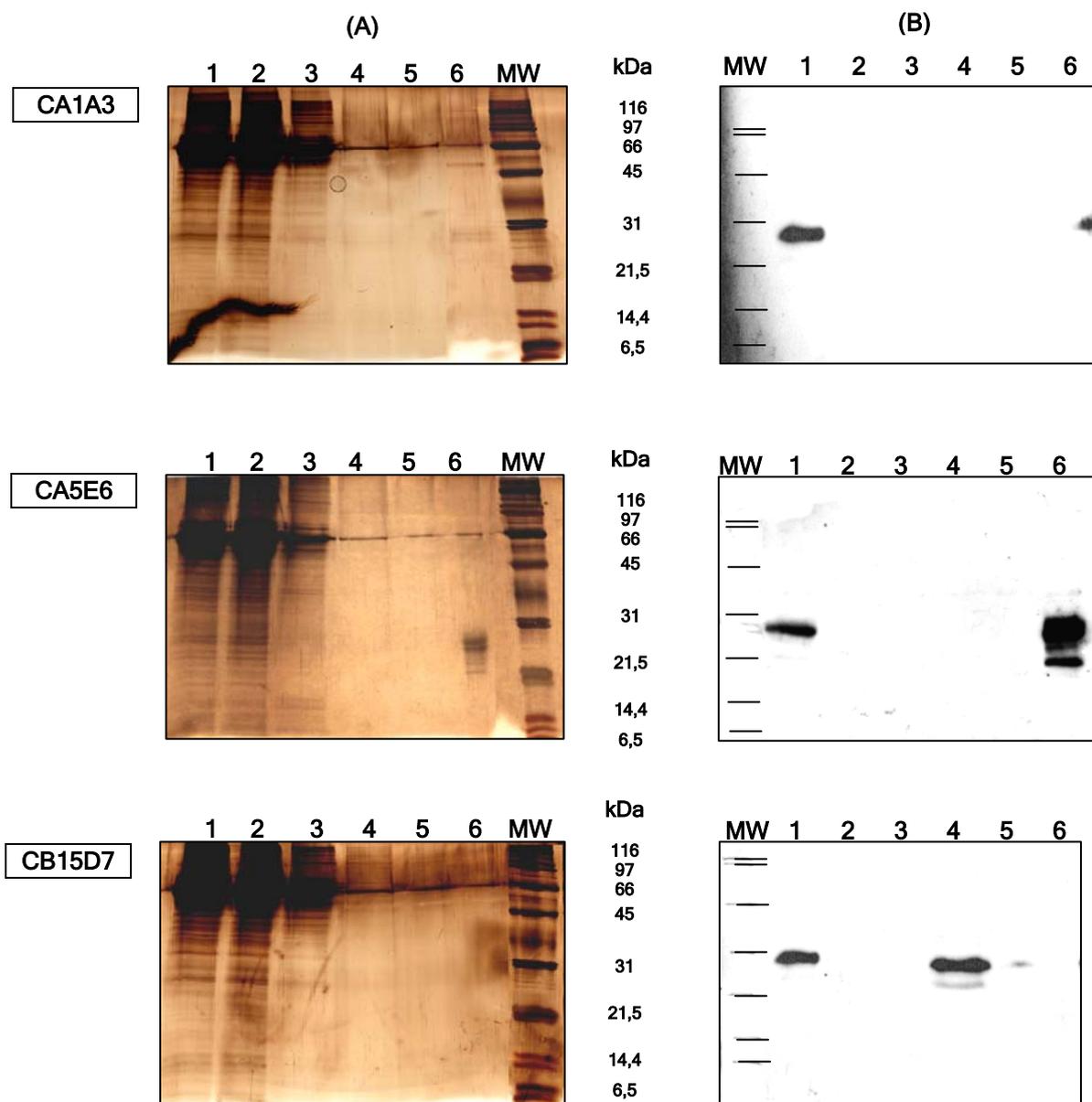


Fig. 41. Análisis de la purificación del rhIFN- α 2bD77N mediante cromatografía de inmunoafinidad empleando técnica de SDS-PAGE en condiciones reductoras con posterior tinción argéntica (A) y *Western blot* (B).

Se analizaron las muestras correspondientes a las diferentes etapas de la purificación.

- Calles: 1: Sobrenadante de cultivo.
 2: *Flowthrough*.
 3: Lavado 1.
 4: Lavado 2.
 5: Lavado 3.
 6: Elución.
 MW: Marcadores de masa molecular.

6.3.2.2. EVALUACIÓN DE DIFERENTES CONDICIONES DE ELUCIÓN DEL rhIFN- α 2b EMPLEANDO LA MATRIZ DE INMUNOAFINIDAD CA5E6-SEPHAROSE

Desafortunadamente, no existe un método de elución universal aplicable a todas las matrices de afinidad. Si bien la desorción de un antígeno de una matriz generalmente es sencilla, el mayor esfuerzo consiste en diseñar y ensayar condiciones para lograr una recuperación cuantitativa. La elución se puede realizar mediante tres tipos de estrategias: el uso de condiciones drásticas para anular la interacción, la adición de un compuesto que imita el sitio de unión de la proteína de interés o el tratamiento con un agente que induce un cambio alostérico que permite la liberación del antígeno. La metodología de elución más comúnmente empleada se basa en la ruptura de los enlaces establecidos entre el antígeno y el anticuerpo, que incluyen interacciones electrostáticas, hidrofóbicas y puentes de hidrógeno. Esto puede lograrse a través de un cambio de pH (ya sea un aumento o una disminución), un aumento de la fuerza iónica, el uso de detergentes iónicos y de agentes caotrópicos o una disminución de la polaridad del eluyente mediante el empleo de solventes orgánicos. El perfil de elución ideal generará un pico agudo con una liberación completa del antígeno luego del tratamiento con una única solución. Sin embargo, se debe establecer un compromiso entre la severidad de las condiciones utilizadas y el riesgo de desnaturalización del material eluido. Además, si se desea reutilizar la matriz, debe tenerse en cuenta la estabilidad del ligando adsorbido.

Considerando que la disminución del pH de la matriz CA5E6-*Sepharose* hasta un valor igual a 3 no fue suficiente para producir la desorción total del rhIFN- α 2bD77N, se estudió la capacidad elutoria de diferentes soluciones. Las experiencias se realizaron utilizando 1 ml de matriz previamente equilibrada en las mismas condiciones de adsorción, a la cual se aplicaron 30 ml de sobrenadante de cultivo conteniendo la muteína rhIFN- α 2bD77N. Luego de la siembra la matriz se lavó con 5 VC de solución de equilibrado y la citoquina se recuperó empleando diferentes soluciones eluyentes (Fig. 42).

La disminución del pH resultó la mejor estrategia para lograr la desorción de la muteína. Cuando la elución se realizó a flujo constante, se observó un aumento de la recuperación del rhIFN- α 2bD77N en forma concomitante con el descenso del pH. No ocurrió así cuando la elución a pH 2,5 se llevó a cabo mediante detención del flujo, donde se obtuvo una menor recuperación con respecto a la obtenida a pH 3. Esto puede deberse a que, a flujo constante, a medida que la fase móvil desciende por la columna arrastra cualquier antígeno que se disocia del anticuerpo, mientras que la elución en *batch* permite que la interacción pueda reestablecerse. El aumento de pH, de fuerza iónica y el uso de solventes orgánicos como etilenglicol no produjo la liberación del rhIFN- α 2bD77N en cantidades significativas, obteniéndose valores de recuperación cercanos al 1%. A menudo, el hecho de que un antígeno sea difícil de eluir en las condiciones estándar se debe a la presencia de diferentes tipos de enlaces que promueven su retención. El uso de combinaciones de agentes de elución puede resolver este problema. No obstante, el agregado de dioxano a la solución de pH 2,5 (que presentó una recuperación moderada) disminuyó drásticamente la recuperación del 61% al 4%.

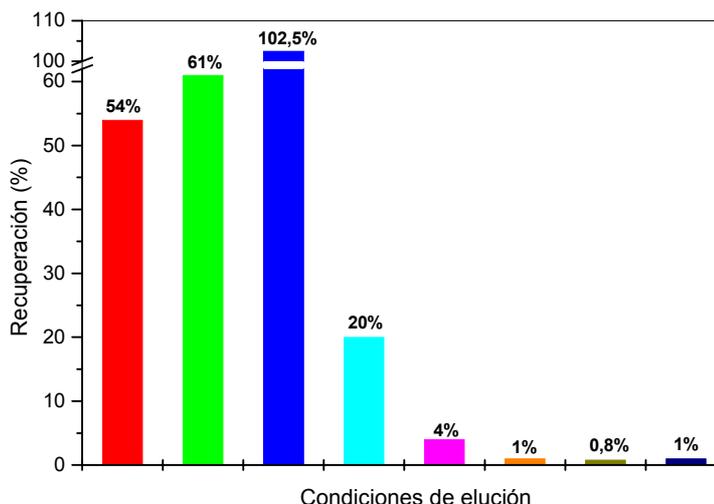


Fig. 42. Recuperaciones del rhIFN- α 2bD77N obtenidas mediante diferentes condiciones de elución aplicadas a la resina CA5E6-*Sepharose*.

Se evaluaron las siguientes condiciones de elución: (■) solución de NaCl 0,15 M en ácido acético 0,2 M, pH 3; (■) solución de glicina 100 mM, pH 2,5; (■) solución de glicina 100 mM, pH 2; (■) solución de glicina 100 mM, pH 2,5, mediante detención del flujo; (■) solución de glicina 100 mM, pH 2,5, con el agregado de dioxano 10% (V/V); (■) solución de glicina 100 mM, pH 10,5; (■) solución de LiCl 5 M en Tris 25 mM, pH 7,5; (■) solución de etilenglicol 50% (V/V) en Tris 25 mM, pH 7,5.

En base a las recuperaciones obtenidas, se seleccionó como estrategia de elución la disminución de pH mediante el empleo de una solución de glicina 100 mM, pH 2. Sin embargo, para la aplicación regular de esta condición debe tenerse en cuenta la estabilidad química de la matriz, del ligando y de las sustancias adsorbidas, dado que el límite de pH que puede utilizarse dependerá de estas propiedades. La matriz de *Sepharose* activada con bromuro de cianógeno es estable en un rango de pH entre 2 y 11 en soluciones acuosas, solventes orgánicos y en presencia de detergentes no iónicos y agentes desnaturizantes. La cuantificación de Igs en todas las fracciones de la purificación demostró que no se produjo desprendimiento de ligando, ni tampoco se observó pérdida de la capacidad de la matriz luego de por lo menos 3 reiteraciones del procedimiento de purificación. Por otra parte, la actividad biológica específica de la citoquina luego de su elución a pH 2 se conservó intacta con respecto a citoquina original presente en la muestra sembrada.

6.3.3. PURIFICACIÓN DEL rhIFN- α 2b *WILD TYPE* Y DEL rhIFN- α 2bD77N EMPLEANDO LA RESINA CA5E6-*SEPHAROSE* MEDIANTE EL PROTOCOLO OPTIMIZADO

El protocolo de purificación optimizado se empleó para la purificación de la muteína rhIFN- α 2bD77N. Se sembraron 170 ml de sobrenadante acondicionado, cuya concentración de rhIFN- α 2bD77N fue de 72 ng.ml⁻¹ (12,2 μ g), en una columna XK 16/20 con 2 ml de matriz CA5E6-*Sepharose*. En la Fig. 43 se muestra el perfil cromatográfico obtenido. Las fracciones recolectadas fueron analizadas por medición de la absorbancia a $\lambda=280$ nm, como parámetro de estimación de proteínas totales, y mediante técnica de ELISA *sandwich*, para determinar la presencia del rhIFN- α 2bD77N. Cabe aclarar que el detergente Tritón X-100 presenta

interferencia en la medición de la absorbancia a $\lambda=280$ nm, por lo que los valores obtenidos para el *flowthrough* y el lavado 1 no se atribuyen únicamente a la presencia de proteínas.

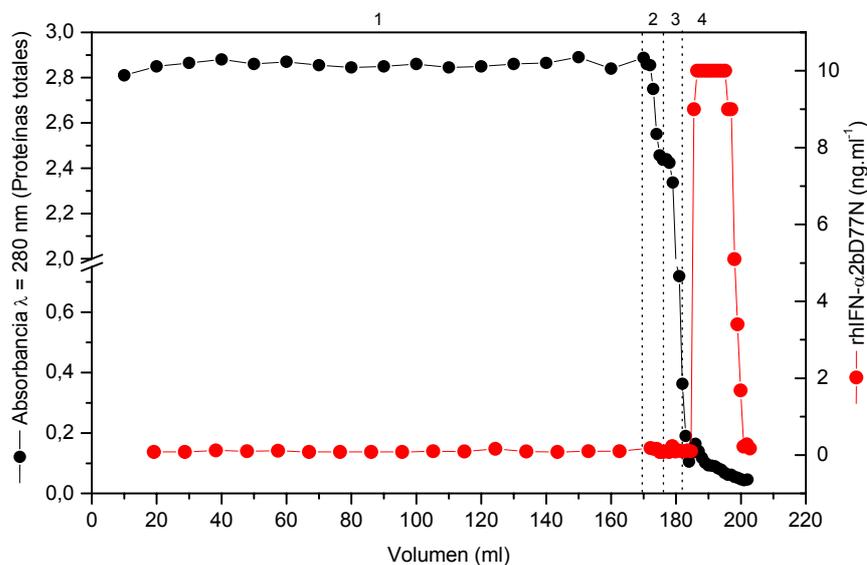


Fig. 43. Purificación del rhIFN- α 2bD77N mediante cromatografía de inmunoadfinidad utilizando la resina CA5E6-*Sepharose*.

En una columna XK16/20 con 2 ml de matriz CA5E6-*Sepharose* se sembraron 170 ml de sobrenadante de cultivo conteniendo la muteína rhIFN- α 2bD77N, a un flujo de $2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. La elución se realizó con solución de glicina 100 mM, pH 2, a un flujo de $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

1: *Flowthrough*.

2: Lavado con solución de NaCl 0,5 M, Tritón X-100 0,2% (V/V) en Tris 25 mM, pH 7,5 (lavado 1).

3: Lavado con solución de NaCl 0,15 M (lavado 2).

4: Elución.

Una limitación de las experiencias anteriores consistió en el flujo lineal de trabajo, el cual resultó muy lento para la etapa de siembra ($0,12 \text{ cm}\cdot\text{min}^{-1}$), durante la cual la citoquina se encuentra expuesta a la acción de proteasas y sialidasas presentes en el sobrenadante de cultivo. Por este motivo, con el fin de minimizar la degradación de la proteína y, a su vez, acortar los tiempos del proceso, se utilizó un flujo lineal de $1 \text{ cm}\cdot\text{min}^{-1}$ durante la etapa de siembra y $0,5 \text{ cm}\cdot\text{min}^{-1}$ durante las siguientes etapas de la purificación. Se respetó la velocidad de flujo lineal máxima que permite la matriz de *Sepharose* 4B ($1,25 \text{ cm}\cdot\text{min}^{-1}$).

Se observó que, al flujo de trabajo, la matriz fue capaz de captar toda la masa del rhIFN- α 2bD77N sembrada, sin pérdida de la citoquina en ninguno de los lavados. El pico de elución de la muteína coincidió, en las primeras fracciones, con un pequeño pico visualizado por lectura de la absorbancia a $\lambda=280$ nm. Las fracciones correspondientes a la elución fueron concentradas y diafiltradas. La Tabla XXI resume los parámetros calculados para evaluar la *performance* de la purificación realizada. Se obtuvo un factor de purificación muy similar al calculado cuando se realizó la elución a pH 3, con un rendimiento ampliamente superior.

Tabla XXI. Parámetros de purificación del rhIFN- α 2bD77N utilizando el protocolo de purificación optimizado.

Muestra	rhIFN- α 2bD77N ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	Proteínas totales ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	Actividad específica (A.E.)	Factor de purificación (F.P.)	Rendimiento (%)
Sobrenadante de cultivo	0,07	295,00	$2,37 \cdot 10^{-4}$	-	-
Elución	7,43	27,60	0,27	1.139	116

La purificación del rhIFN- α 2b *wild type* se llevó a cabo utilizando el mismo protocolo optimizado. Se sembraron 180 ml de sobrenadante de cultivo, cuya concentración de rhIFN- α 2b fue de $94,2 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ (17 μg). Si bien el rendimiento de la purificación fue muy bueno (80%), se obtuvo una menor recuperación con respecto a la obtenida para la muteína rhIFN- α 2bD77N, probablemente debido a la mayor afinidad que presentaría el anticuerpo por esta molécula.

La pureza de ambas moléculas recuperadas de la matriz CA5E6-*Sepharose* fue analizada mediante técnica de SDS-PAGE en condiciones reductoras con posterior tinción argéntica (Fig. 44A). La determinación del porcentaje de pureza se realizó mediante densitometría de las bandas coloreadas, obteniéndose un valor de 87,9% para el rhIFN- α 2bD77N y de 82,2% para el rhIFN- α 2b *wild type*. El principal contaminante lo constituyó la seroalbúmina bovina proveniente del SFB utilizado como suplemento del medio de cultivo.

Mediante ensayos de *Western blot* se observó que los perfiles de glicofomas de ambas moléculas en la elución se conservaron idénticos a los correspondiente a las citoquinas presentes en las muestras originales sembradas (Fig. 44B). La actividad biológica específica antiviral también se preservó luego del proceso de purificación (resultados no mostrados).

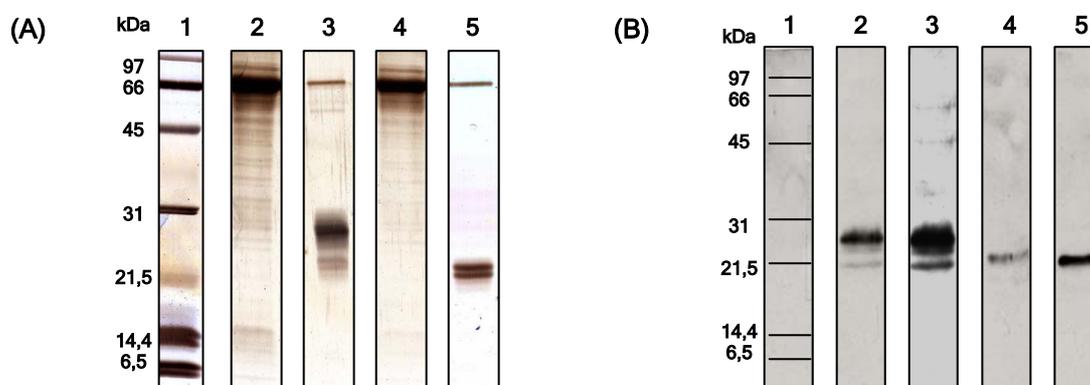


Fig. 44. SDS-PAGE en condiciones reductoras con tinción argéntica (A) y *Western blot* (B) de la purificación del rhIFN- α 2bD77N y del rhIFN- α 2b *wild type* mediante cromatografía de inmunoafinidad utilizando la resina CA5E6-*Sepharose*.

Se analizaron las muestras correspondientes a la siembra y a la elución concentrada y diafiltrada.

- Calles:
- 1: Marcadores de masa molecular.
 - 2: Siembra correspondiente al rhIFN- α 2bD77N.
 - 3: Elución correspondiente al rhIFN- α 2bD77N.
 - 4: Siembra correspondiente al rhIFN- α 2b *wild type*.
 - 5: Elución correspondiente al rhIFN- α 2b *wild type*.

6.4. EVALUACIÓN DE LA FARMACOCINÉTICA DEL rhIFN- α 2b NO GLICOSILADO, rhIFN- α 2b *WILD TYPE* Y rhIFN- α 2bD77N EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

La importancia de los carbohidratos sobre diversas propiedades biológicas de glicoproteínas ha sido ampliamente documentada. Los oligosacáridos poseen un marcado efecto sobre la solubilidad, estabilidad, bioactividad, antigenicidad y farmacocinética de las glicoproteínas. Una propiedad crítica que determina la eficacia de una proteína terapéutica es su *clearance* plasmático. Un adecuado control de la concentración de un fármaco en plasma a lo largo del tiempo puede llevar a una mayor eficacia y disminución de efectos colaterales indeseados (Marshall y col., 2003).

Con el propósito de evaluar la influencia de la porción glicosídica sobre los parámetros farmacocinéticos de la muteína con un sitio de *N*-glicosilación rhIFN- α 2bD77N, se realizaron experimentos *in vivo* utilizando animales de experimentación, en comparación con la molécula *O*-glicosilada (rhIFN- α 2b *wild type*) y su análoga no glicosilada producida en bacterias.

Tres lotes de tres animales cada uno fueron inyectados por vía subcutánea con una dosis única de $5 \cdot 10^5$ UI.kg⁻¹ de peso corporal del animal de cada variante del rhIFN- α 2b. Las muestras del rhIFN- α 2b *wild type* y rhIFN- α 2bD77N fueron obtenidas mediante purificación de los correspondientes sobrenadantes de cultivo utilizando cromatografía de inmunoafinidad. La muestra del rhIFN- α 2b no glicosilado correspondió al estándar utilizado en los ensayos de ELISA. La cuantificación de la citoquina en el plasma, correspondiente a los distintos tiempos post-inyección, se realizó mediante valoración de su actividad biológica antiviral volumétrica. En la Fig. 45 se muestra el perfil de actividad biológica antiviral de cada muestra en función del tiempo transcurrido desde la inoculación de la molécula.

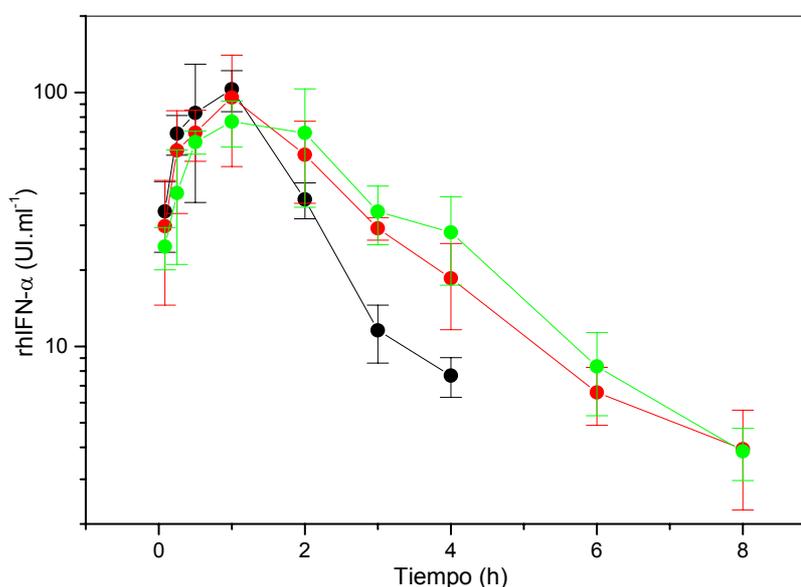


Fig. 45. Perfil farmacocinético de variantes del rhIFN- α 2b luego de su inoculación subcutánea en animales de experimentación.

Se graficó la actividad biológica plasmática del rhIFN- α 2b no glicosilado (●), rhIFN- α 2b *wild type* (con un sitio de *O*-glicosilación) (●) y rhIFN- α 2bD77N (con un sitio de *O*-glicosilación y un sitio de *N*-glicosilación) (●) en el eje de ordenadas, en función del tiempo transcurrido desde la inyección, en el eje de abscisas. Los resultados se muestran como el valor promedio \pm SD (n=3).

Luego de la fase de absorción, el patrón de eliminación de las tres moléculas fue gobernado por una cinética de primer orden, lo que se evidenció por la obtención de una línea recta cuando se graficó la actividad biológica plasmática en función del tiempo en escala semilogarítmica. Este resultado sugiere que, mediante esta vía de administración, se produce una distribución casi instantánea de las citoquinas, lo que permite ajustar su comportamiento a un modelo unicompartmental, con una velocidad global de absorción y una velocidad de eliminación de primer orden. De esta manera, teniendo en cuenta las ecuaciones que rigen este modelo (sección 18.2 de Materiales y Métodos), se determinaron los parámetros farmacocinéticos que caracterizan el comportamiento de las tres variantes del rhIFN- α 2b evaluadas luego de su inyección subcutánea en ratas (Tabla XXII). Los parámetros hallados se compararon utilizando el test *t* de Student o el ANOVA, según correspondiese, considerando la existencia de diferencias significativas entre muestras cuando $p < 0,05$.

Tabla XXII. Parámetros farmacocinéticos de variantes del rhIFN- α 2b luego de su inyección subcutánea en ratas.

Variante de rhIFN- α 2b	$T_{m\acute{a}x}$ (h)	$C_{m\acute{a}x}$ (UI.ml ⁻¹)	$t_{1/2elim}$ (h)	AUC (UI.h.ml ⁻¹)	CL _{app} (ml.h ⁻¹)
rhIFN- α 2b no glicosilado	0,52 \pm 0,07	123,5 \pm 38,8	0,64 \pm 0,12	189,5 \pm 16,5	530,3 \pm 44,5
rhIFN- α 2b <i>wild type</i>	0,78 \pm 0,12	77,9 \pm 21,8	1,38 \pm 0,33	178,4 \pm 1,0	560,5 \pm 3,1
rhIFN- α 2bD77N	0,99 \pm 0,18	61,5 \pm 6,8	1,68 \pm 0,05	214,1 \pm 52,5	489,5 \pm 137,3

Los parámetros fueron calculados para cada animal y se expresan como el valor promedio \pm SD (n=3).

El pico de actividad biológica plasmática para la molécula no glicosilada se produjo anticipadamente con respecto a las citoquinas *O*- y *N,O*-glicosiladas ($p=0,01$), no observándose diferencias significativas entre el valor de $T_{m\acute{a}x}$ de las variantes con diferente tipo de glicosilación ($p=0,17$). De esta manera, la proteína no glicosilada presentó una mayor velocidad de absorción, obteniéndose una $C_{m\acute{a}x}$ más elevada en forma temprana, lo que indica que, independientemente del tipo de enlace glicosídico involucrado, la presencia de oligosacáridos prolonga la fase de absorción de la molécula.

Por otra parte, el tiempo de vida media de la fase de eliminación fue 2,2 y 2,6 veces superior para la variante *O*-glicosilada y *N,O*-glicosilada, respectivamente, comparado con el correspondiente a la proteína producida en bacterias ($p=0,02$ y $p=1,50 \cdot 10^{-4}$, respectivamente). Esta última fue rápidamente eliminada de la circulación, con un $t_{1/2elim}$ similar al reportado en la literatura (Bailon y col., 2001). Mientras que la actividad plasmática de la molécula no glicosilada no se pudo determinar luego de las 4 h post-inyección, los análogos glicosilados presentaron valores de actividad biológica detectables luego de 8 h transcurridas desde su administración.

Estos resultados son consistentes con los efectos de la glicosilación sobre la farmacocinética de otras proteínas (Varki, 1993). Se ha encontrado que la presencia de *O*-glicosilación prolonga tanto la vida media de distribución como la de eliminación del IGFBP-6 (*insulin-like growth factor binding protein-6*) luego de su administración endovenosa (Marinaro y col., 2000). Esta proteína se encuentra *O*-glicosilada en 5 residuos de Ser o Thr de su secuencia aminoacídica, lo que explica el importante aumento en el $t_{1/2elim}$ con respecto a su homóloga no glicosilada (21 veces superior). La presencia de un único sitio de *O*-glicosilación en la molécula de rhIFN- α 2b *wild type* sería responsable de la menor diferencia observada en el $t_{1/2elim}$ con respecto a la versión no glicosilada. Por otra parte, los carbohidratos aumentan la vida media en circulación de un gran número de *N*-glicosilproteínas, como la eritropoyetina (Jelkmann, 2006), el

activador del plasminógeno tisular (Larsen y col., 1989), la hormona luteinizante humana (Burgon y col., 1996), la hormona folículo estimulante (D'Antonio y col., 1999) y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humano (Marini y col., 2007), entre muchas otras. Todos estos ejemplos representan proteínas con múltiples sitios de *N*-glicosilación, por lo que los resultados reportados para las mismas no pueden compararse directamente con la muteína rhIFN- α 2bD77N.

No obstante, no se encontraron diferencias apreciables entre el *clearance* sistémico aparente de los tres análogos del rhIFN- α 2b evaluados ($p=0,60$). Es probable que la mayor concentración plasmática alcanzada en el pico de absorción de la citoquina no glicosilada produzca un aumento en el área bajo la curva que compensa el aumento del $t_{1/2elim}$ de ambas moléculas glicosiladas. Sin embargo, el perfil farmacocinético de las citoquinas glicosiladas, que resultó en una concentración plasmática relativamente más estable, podría ser terapéuticamente más efectivo que una $C_{m\acute{a}x}$ de actividad más elevada que disminuye rápidamente luego de la inyección de una molécula de corta vida media como el rhIFN- α 2b producido en *E. coli*.

Notablemente, ninguno de los parámetros farmacocinéticos determinados para la muteína con un sitio de *N*-glicosilación adicional, rhIFN- α 2bD77N, resultó significativamente diferente con respecto a los valores hallados para la citoquina *wild type*, a pesar del incremento en la masa molecular observado en ensayos de *Western blot*. Se han reportado diversos mecanismos mediante los cuales los carbohidratos, conjugados a las cadenas polipeptídicas a través de cualquier tipo de enlace, podrían contribuir a la mejora de las propiedades farmacocinéticas de glicoproteínas. Tanto la masa que aportan los oligosacáridos como la carga negativa de los ácidos siálicos terminales disminuyen la velocidad de filtración glomerular, mecanismo de eliminación muy importante para proteínas pequeñas de una masa molecular inferior a 70 kDa (Baenziger, 1996). Además, la presencia de residuos de ácido siálico también inhibe la unión a receptores de glicoproteínas desializadas, protegiéndolas de este mecanismo de depuración (Morell y col., 1971). Probablemente, la adición de un único sitio de *N*-glicosilación a la proteína *O*-glicosilada no fue suficiente para que estos mecanismos afecten la velocidad de depuración de la citoquina en forma considerable. Las diferencias observadas entre la molécula no glicosilada y las dos variantes glicosiladas podrían atribuirse en mayor medida a la presencia de ácidos siálicos, requiriéndose mayores incrementos de la masa molecular para que la filtración a través del glomérulo se vea comprometida en mayor grado. La construcción de moléculas hiperglicosiladas constituye una estrategia atractiva para la mejora sustancial de las propiedades farmacocinéticas del rhIFN- α 2b.

7. SELECCIÓN DE SITIOS DE *N*-GLICOSILACIÓN PARA LA CONSTRUCCIÓN DE MUTEÍNAS DEL rhIFN- α 2b HIPERGLICOSILADAS

Teniendo en cuenta que no se encontraron diferencias significativas en la farmacocinética de la variante con un sitio de *N*-glicosilación rhIFN- α 2bD77N y el rhIFN- α 2b *wild type*, se decidió la construcción de muteínas que contengan un número variable de sitios de *N*-glicosilación. Esta estrategia apunta a aumentar el tamaño molecular y la carga de la molécula, con el fin de disminuir la filtración glomerular, que constituye el mecanismo más importante de *clearance* de la citoquina (Bino y col., 1982; Shetcher y col., 2001).

La selección de las posiciones más adecuadas para la introducción de nuevos sitios de *N*-glicosilación se realizó en base a los resultados de actividad biológica específica y eficiencia de glicosilación obtenidos a partir de la construcción de las 14 variantes con un sitio de

N-glicosilación (sección 5). Dado que, en principio, el diseño de muteínas del rhIFN- α 2b se dirigió al tratamiento de la hepatitis C crónica, se priorizó la conservación de la actividad biológica antiviral de la molécula por sobre la actividad antiproliferativa.

Como se mencionó anteriormente, las muteínas que presentaron una mayor eficiencia de *N*-glicosilación, determinada mediante densitometría de bandas en ensayos de *Western blot*, fueron rhIFN- α 2bP4N, rhIFN- α 2bR23N, rhIFN- α 2bK70N, rhIFN- α 2bD77N (> 50%), rhIFN- α 2bL95T (\approx 40%) y rhIFN- α 2bF47T y rhIFN- α 2bE113N (\approx 30 %). En base a los requisitos buscados, las variantes rhIFN- α 2bP4N y rhIFN- α 2bD77N habían sido seleccionadas previamente, por lo que se respetó dicha elección para la introducción simultánea de ambas mutaciones en una única molécula con dos sitios de *N*-glicosilación (rhIFN- α 2b2N). Del resto de las variantes mencionadas, sólo rhIFN- α 2bF47T y rhIFN- α 2bE113N retuvieron tanto su actividad biológica antiviral como antiproliferativa. No obstante, la mejora de las propiedades farmacocinéticas puede ser tan vital para la eficacia de una proteína terapéutica que muchas veces se logra a expensas de su actividad específica. La Aranesp[®] (rhEPO hiperglicosilada) (MacDougall y col., 1999) y el PEG-Intron[®] (rhIFN- α 2b conjugado con una molécula de PEG de 12 kDa) (Wang y col., 2002) constituyen algunos ejemplos de cómo la modificación del *clearance* plasmático puede aumentar la eficacia clínica a pesar de la reducción de la actividad biológica *in vitro*. Por este motivo, el grado de glicosilación se consideró una condición prioritaria. De esta manera, se seleccionó la mutación R23N para construir una variante con tres sitios de *N*-glicosilación (rhIFN- α 2b3N), a pesar de que dicha variante conservó su actividad antiviral pero no su acción antiproliferativa. Asimismo, la mutación K70N, que produjo una disminución de la actividad biológica antiviral de la citoquina, se introdujo en la molécula para la obtención de una variante con cuatro sitios de *N*-glicosilación (rhIFN- α 2b4N). En ambos casos, no se consideró la sustitución de la L95 por Thr debido a que la misma contribuyó simultáneamente a la alteración de las dos funciones biológicas evaluadas, además de exhibir menor proporción de isoformas glicosiladas. Finalmente, en aras de evitar la completa pérdida funcional de la citoquina, se adicionó un último sitio de *N*-glicosilación mediante la mutación del E113 por Asn, obteniéndose una muteína con 5 sitios potenciales de *N*-glicosilación (rhIFN- α 2b5N). Todas estas muteínas individuales fueron reconocidas por el mAb CA5E6 en los ensayos de ELISA *sandwich*, lo cual constituye una ventaja operativa dado que la purificación por inmunoafinidad fue optimizada mediante el uso de dicho anticuerpo.

8. CONSTRUCCIÓN DE MUTEÍNAS DEL rhIFN- α 2b CON UN NÚMERO VARIABLE DE SITIOS DE *N*-GLICOSILACIÓN

Las muteínas rhIFN- α 2b2N, rhIFN- α 2b3N, rhIFN- α 2b4N y rhIFN- α 2b5N fueron construidas secuencialmente mediante la técnica de mutagénesis sitio dirigida. En primer lugar, utilizando como molde el plásmido pCI-neo rhIFN- α 2bD77N, se introdujo la mutación Pro4 por Asn, obteniéndose la variante rhIFN- α 2b2N (rhIFN- α 2bP4N/D77N), la cual fue clonada en el plásmido pCI-neo. Posteriormente, utilizando como molde el plásmido pCI-neo rhIFN- α 2bP4N/D77N se repitió el mismo procedimiento para obtener la variante rhIFN- α 2b3N (rhIFN- α 2bP4N/R23N/D77N) y así, sucesivamente, se contruyeron las muteínas rhIFN- α 2b4N (rhIFN- α 2bP4N/R23N/K70N/D77N) y rhIFN- α 2b5N (rhIFN- α 2bP4N/R23N/K70N/D77N/E113N). Todas las variantes fueron clonadas en el plásmido pCI-neo. La secuenciación de un clon representante de cada muteína demostró la presencia de las mutaciones correspondientes,

observándose además la ausencia de modificaciones indeseadas durante todas las etapas de PCR y clonado molecular (resultados no mostrados).

9. CARACTERIZACIÓN DE LAS MUTEÍNAS DEL rhIFN- α 2b CON UN NÚMERO VARIABLE DE SITIOS DE *N*-GLICOSILACIÓN

9.1. TRANSFECCIONES TRANSITORIAS DE CÉLULAS CHO.K1

Con el fin de caracterizar las muteínas derivadas del rhIFN- α 2b con un número variable de sitios de *N*-glicosilación, en cuanto a su actividad biológica específica y grado de glicosilación, se realizaron transfecciones transitorias de células CHO.K1 con los plásmidos de expresión correspondientes. Transcurridas 72 h post-transfección, se cosechó el sobrenadante de cultivo de los pozos y se conservó para su posterior análisis.

9.2. CUANTIFICACIÓN DE LAS MUTEÍNAS PRESENTES EN LOS SOBRENADANTES DE CULTIVO MEDIANTE TÉCNICA DE ELISA *SANDWICH* Y DE ELISA DE COMPETICIÓN

Las muteínas con un número variable de sitios de *N*-glicosilación presentes en los sobrenadantes de cultivo obtenidos de las transfecciones transitorias fueron cuantificadas mediante técnica de ELISA *sandwich* utilizando los mAbs CA1A3, CA5E6 y CB15D7 como anticuerpos de captura. De esta manera, se confirmaron los resultados obtenidos previamente utilizando las variantes mutadas en un solo sitio, ya que la molécula rhIFN- α 2b2N fue reconocida por los tres mAbs, mientras que las variantes rhIFN- α 2b3N y rhIFN- α 2b4N sólo fueron reconocidas por dos de ellos (CA5E6 y CB15D7) y la muteína rhIFN- α 2b5N sólo por el mAb CA5E6.

Sin embargo, se observó que, a medida que se adicionaban nuevos sitios de *N*-glicosilación a la molécula, determinados parámetros del ensayo, como la pendiente de la curva de dosis-respuesta y la absorbancia máxima correspondiente a la zona de saturación de la misma, exhibían mayores diferencias con respecto a los hallados para la curva del rhIFN- α 2b no glicosilado utilizado como estándar (Fig. 46). La menor pendiente podría deberse a una disminución de la afinidad del anticuerpo debido al alto contenido de glúcidos de las variantes del rhIFN- α 2b. Las estructuras glicosídicas presentes en cada uno de los sitios de *N*-glicosilación no cancelarían el reconocimiento del epítipo por parte del anticuerpo, pero la suma de ellas podría interferir en la unión por impedimento estérico. No obstante, la menor absorbancia de la zona de saturación de la curva obtenida para las moléculas hiperglicosiladas sugiere que, probablemente, el mAb sea capaz de captar a la molécula en fase sólida pero disminuya la cantidad de anticuerpos policlonales que interaccionen en la segunda etapa. Una vez que la variante de rhIFN- α 2b fue captada por el mAb, la proporción de estructura peptídica con respecto a las estructuras glicosídicas expuestas disminuye, dejando menor cantidad de sitios disponibles para la interacción de los anticuerpos policlonales. En consecuencia, se observará una menor absorbancia en la zona de saturación, independientemente de que todas las moléculas de mAb en fase sólida hayan interaccionado con el antígeno.

Así, aunque el doble reconocimiento del analito en un ELISA *sandwich* constituye una ventaja en términos de especificidad, este requerimiento puede resultar limitante cuando se comparan antígenos que no cumplen con el requisito de identidad. En este sentido, los ensayos competitivos constituyen procedimientos de mayor utilidad para la cuantificación de citoquinas

recombinantes cuyo estándar difiere con respecto al analito en alguna modificación post-traduccional como la glicosilación. En este método sólo participa un único epítopo de la molécula con la exigencia de ser reconocida en forma idéntica por el mAb seleccionado.

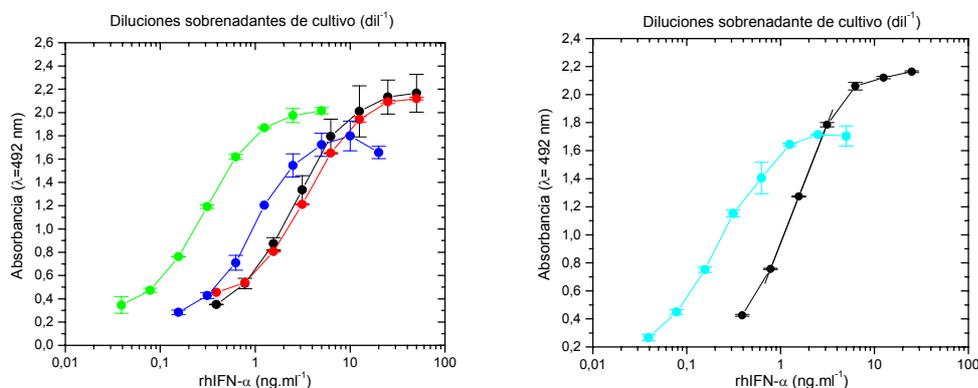


Fig. 46. Cuantificación de las muteínas del rhIFN- α 2b con un número variable de sitios de *N*-glicosilación mediante técnica de ELISA *sandwich*.

La cuantificación de las variantes glicosiladas rhIFN- α 2b2N (●), rhIFN- α 2b3N (●), rhIFN- α 2b4N (●) y rhIFN- α 2b5N (●), presentes en sobrenadantes de cultivo, fue realizada frente al estándar de rhIFN- α 2b no glicosilado (●). Las curvas correspondientes al estándar y a las muestras fueron procesadas por duplicado y los resultados se muestran como el valor promedio \pm SD.

Sobre la base de esta propiedad, se utilizó el ensayo de ELISA de competición utilizando el mAb CA5E6, puesto a punto previamente (sección 1.1.2), para estimar la concentración de las muteínas con un número variable de sitios de *N*-glicosilación (Fig. 47). La concentración del rhIFN- α 2b2N en el sobrenadante de cultivo se encontró cercana al límite de detección de esta técnica, por lo que el error en la determinación puede ser considerable. Para el resto de las moléculas, las concentraciones obtenidas mediante este esquema de ELISA fueron significativamente mayores a las halladas mediante el sistema *sandwich*, observándose una mejora en el paralelismo de las curvas. De este resultado se desprende que la técnica de ELISA *sandwich* produce una subvaloración de la concentración de las citoquinas con dos o más sitios de *N*-glicosilación. En la Tabla XXIII se muestran los resultados de la cuantificación de las variantes hiperglicosiladas del rhIFN- α 2b presentes en los sobrenadantes de cultivo mediante ambas metodologías. Se observa claramente el aumento del cociente R a medida que se incrementa el número de sitios de *N*-glicosilación. De esta manera, la perturbación generada por la introducción de mutaciones y/o la presencia de estructuras glicosídicas afectó en mayor proporción al ELISA *sandwich*.

El sistema de ELISA competitivo requiere ser homologado mediante la cuantificación de las citoquinas por otros ensayos, fundamentalmente por un método de referencia para la determinación de proteínas. Sin embargo, esto requiere la obtención de las muteínas con un elevado grado de pureza y en mayor concentración. Debido a la necesidad de detectar la presencia de las mismas en sobrenadantes de cultivo, monitorear su expresión durante el proceso productivo y determinar su concentración como método para evaluar rendimientos del proceso de purificación, el ensayo de ELISA de competición empleando el mAb CA5E6 y la

molécula no glicosilada como estándar constituyó una metodología útil en el laboratorio para el cumplimiento de los fines mencionados.

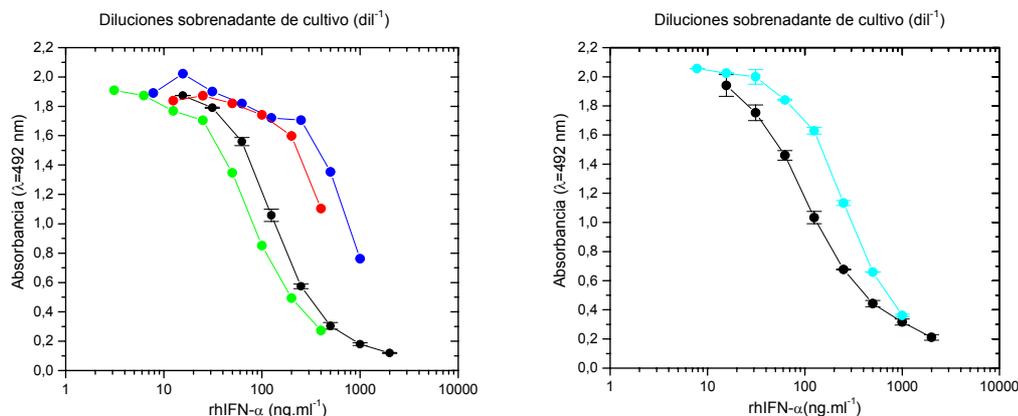


Fig. 47. Cuantificación de las muteínas del rhIFN- α 2b con un número variable de sitios de *N*-glicosilación mediante técnica de ELISA competitivo.
 La cuantificación de las variantes glicosiladas rhIFN- α 2b2N (●), rhIFN- α 2b3N (●), rhIFN- α 2b4N (●) y rhIFN- α 2b5N (●), presentes en sobrenadantes de cultivo, fue realizada frente al estándar de rhIFN- α 2b no glicosilado (●). Las curvas correspondientes al estándar y las muestras fueron procesadas por duplicado y los resultados se muestran como el valor promedio \pm SD.

Tabla XXIII. Cuantificación de las muteínas del rhIFN- α 2b con un número variable de sitios de *N*-glicosilación mediante técnica de ELISA *sandwich* y de ELISA competitivo.

Variante del rhIFN- α 2b	ELISA <i>sandwich</i> (ES) (ng.ml ⁻¹)	ELISA de competición (EC) (ng.ml ⁻¹)	R*
rhIFN- α 2b2N	177,0	276,1	1,56
rhIFN- α 2b3N	807,0	1.886,9	2,33
rhIFN- α 2b4N	29,3	162,0	5,53
rhIFN- α 2b5N	45,2	574,7	12,71

*R= concentración variante del rhIFN- α 2b por técnica de EC/concentración variante del rhIFN- α 2b por técnica de ES.

9.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA ESPECÍFICA ANTIVIRAL Y ANTIPROLIFERATIVA DE LAS MUTEÍNAS PRESENTES EN LOS SOBRENADANTES DE CULTIVO

La determinación de la actividad biológica específica de las variantes del rhIFN- α 2b con un número variable de sitios de *N*-glicosilación se realizó mediante valoración de la actividad biológica antiviral y antiproliferativa y cuantificación por ELISA de competición de las citoquinas presentes en los sobrenadantes de cultivo (Tabla XXIV). Todos los experimentos se realizaron por triplicado, reiterándose la experiencia en tres ocasiones diferentes.

El valor de actividad biológica específica antiviral para la molécula de rhIFN- α 2b2N concuerda con el reportado para la proteína *wild type* (Rossman y col., 1996). No ocurre así con la actividad biológica específica antiproliferativa, la cual fue inferior con respecto al rango

informado por diversos autores (150-220 UI.ng⁻¹), conservando un 80% del valor correspondiente al límite inferior del mismo. Considerando que, individualmente, la introducción de las mutaciones no afectó ninguna de las funciones biológicas de la citoquina evaluadas, podría proponerse que la disminución de la afinidad de unión al receptor debido al elevado contenido de glúcidos o a pequeñas modificaciones estructurales afectaría en mayor medida la actividad antiproliferativa que la actividad antiviral. En apoyo a esta idea, se ha demostrado que la activación transcripcional que lleva a una respuesta antiviral es mediada por la activación del complejo ifnar1/ifnar2 por el IFN en el contexto de una interacción de baja afinidad, mientras que se necesita una interacción de alta afinidad para disparar los eventos de transducción de señales que median la inhibición del crecimiento (Ghislain y col., 1995).

La actividad biológica antiviral disminuyó gradualmente a medida que se incorporaron nuevos sitios de *N*-glicosilación, no encontrándose diferencias significativas entre las moléculas con 4 y 5 sitios, que conservaron un 15% de la actividad de la citoquina nativa. No obstante, la capacidad inhibitoria del crecimiento se redujo drásticamente cuando se construyó la variante con tres sitios de *N*-glicosilación (6% de la correspondiente a la proteína *wild type*), confirmando que, ya sea la sustitución del residuo R23 por Asn o la adición de carbohidratos al mismo, influye notoriamente sobre la acción antiproliferativa del rhIFN- α 2b. La introducción de nuevas mutaciones continuó el descenso del valor de actividad específica antiproliferativa, pero de manera más atenuada, obteniéndose valores de un 2% y un 0,5% de la actividad específica antiproliferativa de la proteína natural para el rhIFN- α 2b4N y el rhIFN- α 2b5N, respectivamente.

La baja actividad *in vitro* obtenida no debe considerarse un impedimento para evaluar las moléculas glicosiladas como agentes terapéuticos. Existen numerosas evidencias que demuestran el error que implica confiar en los ensayos *in vitro* para predecir la actividad biológica *in vivo* y los efectos terapéuticos de una molécula. Los bioensayos *in vitro* no tienen en cuenta las diferencias farmacocinéticas entre los compuestos, ni las diferencias en la distribución corporal o en su metabolismo (Egrie y col., 2003).

Tabla XXIV. Determinación de la actividad biológica específica antiviral y antiproliferativa de las muteínas del rhIFN- α 2b con un número variable de sitios de *N*-glicosilación.

Variante del rhIFN- α 2b	Actividad biológica específica antiviral (UI.ng ⁻¹)	Actividad biológica específica antiproliferativa (UI.ng ⁻¹)
rhIFN- α 2b2N	209,7 ± 24,4	120,0 ± 7,4
rhIFN- α 2b3N	117,9 ± 25,3	10,4 ± 6,9
rhIFN- α 2b4N	26,5 ± 5,8	2,8 ± 1,1
rhIFN- α 2b5N	30,5 ± 7,9	0,9 ± 0,3

9.4. EVALUACIÓN DEL GRADO DE GLICOSILACIÓN DE LAS VARIANTES DEL rhIFN- α 2b MEDIANTE ENSAYOS DE *WESTERN BLOT*

El análisis del patrón de glicosilación de las muteínas con más de un sitio de *N*-glicosilación se realizó mediante SDS-PAGE y posterior *Western blot*, utilizando anticuerpos policlonales de conejo anti-rhIFN- α 2b para asegurar el reconocimiento de todas las isoformas (Fig. 48A). En forma concomitante al aumento del número de sitios incorporados, se observó un incremento en la masa molecular de las diferentes variantes y la desaparición de glicofomas de

menor masa molecular. En particular, la expresión de la muteínas rhIFN- α 2b4N y rhIFN- α 2b5N evidenció la desaparición de las isoformas no glicosilada y *O*-glicosilada y la disminución de los análogos con uno o dos sitios de *N*-glicosilación. Por otra parte, se observaron mínimas diferencias en el perfil electroforético y la masa molecular máxima alcanzada por ambas variantes, indicando que, en la proteína con cinco sitios de *N*-glicosilación, alguno de los sitios no es eficientemente ocupado. Es posible que, para una proteína de una determinada masa molecular, se produzca una saturación en el número de sitios de *N*-glicosilación que puedan ser ocupados. Además, mientras que las variantes con uno y dos sitios de *N*-glicosilación presentaron dos o tres bandas acotadas en un rango de masa molecular entre 23,5 y 33 kDa, las muestras correspondientes a los análogos con tres, cuatro y cinco sitios de *N*-glicosilación exhibieron una mayor heterogeneidad de masas moleculares con múltiples bandas no diferenciables en un rango de masa molecular entre 27 y 43,5 kDa.

El tratamiento de todos los sobrenadantes de cultivo con PNGasa F determinó la desaparición de las bandas de mayor masa molecular, observándose sólo aquellas correspondientes a la proteína *O*-glicosilada en el ensayo de *Western blot* (Fig. 48B). De esta manera, se confirmó que la diferencia de masa molecular observada entre las muteínas es causada por la unión de cadenas hidrocarbonadas a través de un enlace *N*-glicosídico en los sitios consenso incorporados.

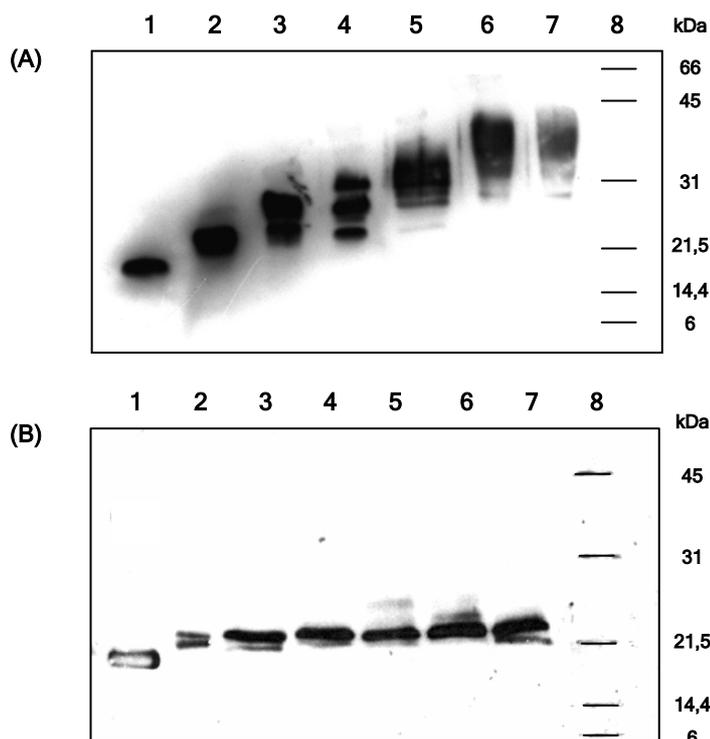


Fig. 48. Evaluación del patrón de glicosilación de muteínas del rhIFN- α 2b con un número variable de sitios de *N*-glicosilación.

Los sobrenadantes de cultivo conteniendo las muteínas del rhIFN- α 2b, obtenidos a partir de transfecciones transitorias, se analizaron mediante técnica de *Western blot* en ausencia (A) y presencia (B) de PNGasa F. En la calle 1 se sembraron 100 ng de estándar de rhIFN- α 2b no glicosilado. En la calle 2 se sembró el sobrenadante conteniendo la citoquina *wild type*. En las calles 3 a 7 se corrieron las muestras conteniendo las variantes del rhIFN- α 2b con un número creciente de sitios potenciales de *N*-glicosilación, desde un único sitio hasta cinco sitios. En la calle 8 se sembraron marcadores de masa molecular.

10. PRODUCCIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FARMACOCINÉTICA DE LAS VARIANTES DEL rhIFN- α 2b HIPERGLICOSILADAS

10.1. OBTENCIÓN DE CLONES ESTABLES DE CÉLULAS CHO.K1 PRODUCTORES DE rhIFN- α 2b2N, rhIFN- α 2b3N, rhIFN- α 2b4N Y rhIFN- α 2b5N

La obtención de clones productores de las variantes del rhIFN- α 2b con dos, tres, cuatro y cinco sitios de *N*-glicosilación se realizó siguiendo el mismo procedimiento llevado a cabo para la proteína *wild type* y las muteínas con un único sitio de *N*-glicosilación. De los clones resistentes obtenidos, se seleccionaron aquéllos que demostraron mayor producción de las citoquinas para evaluar su productividad específica celular en fase estacionaria de cultivo. La productividad específica se evaluó a dos concentraciones de SFB diferentes: 5% (V/V), condición estándar en nuestro laboratorio para el cultivo de células CHO.K1, y 0,5% (V/V), condición seleccionada previamente como óptima para la producción de la citoquina por clones celulares recombinantes (Tabla XXV). La determinación de la concentración del rhIFN- α 2b se realizó por técnica de ELISA *sandwich*, debido a que la baja producción obtenida impidió su cuantificación por el ensayo competitivo. Aún cuando se concluyó que dicha metodología produce una subvaloración de la concentración de las citoquinas con más de un sitio de *N*-glicosilación, resulta útil de todos modos para comparar en forma relativa productividad entre clones que expresan la misma molécula.

Los valores de productividad específica utilizando el medio de cultivo de producción se encontraron en un rango entre 0,4 y 48,8 ng. 10^6 cél⁻¹.día⁻¹, siendo muy variables entre clones que expresan muteínas diferentes. La actividad biológica específica se mantuvo constante entre clones productores de la misma variante, a pesar de que los valores hallados fueron superiores a los estimados previamente debido a la subvaloración de la concentración de las citoquinas presentes en los sobrenadantes por la técnica de ELISA *sandwich*. Asimismo, mediante ensayos de *Western blot*, se comprobó que el perfil de glicoformas de todos los clones de cada variante era muy similar. En la Fig. 49 se muestra, a modo de ejemplo, el perfil electroforético de tres clones productores del rhIFN- α 2b4N. De esta manera, en base a su productividad específica, determinada tanto por ELISA *sandwich* como por actividad biológica antiviral, se seleccionaron los clones 2N2B5, 3N1C1, 4N2F5 y 5N2H8 para realizar la producción de las correspondientes muteínas a mayor escala.

Tabla XXV. Productividades celulares específicas de los diferentes clones productores de las variantes hiperglicosiladas del rhIFN- α 2b.

Variante del rhIFN- α 2b	Clones productores	Productividad específica (ng. 10 ⁶ cél ⁻¹ . día ⁻¹)	
		SFB 5% (V/V)	SFB 0,5% (V/V)
rhIFN- α 2b2N	2N1G1	24,2	12,6
	2N2B5	85,4	48,8
rhIFN- α 2b3N	3N1C1	12,5	6,8
	3N1H8	6,3	3,1
	3N2A6	11,6	2,6
	3N2B5	10,3	3,0
	3N2F6	9,0	2,0
	3N2G8	6,5	4,1
rhIFN- α 2b4N	4N1A8	19,2	11,4
	4N1B8	21,3	12,5
	4N2A8	11,6	5,4
	4N2C8	39,7	16,5
	4N2F5	46,5	29,6
	4N2F7	25,7	15,6
rhIFN- α 2b5N	5N1F6	1,6	0,6
	5N1H2	1,3	0,4
	5N1H5	1,7	0,6
	5N1H6	2,1	0,5
	5N2E1	2,1	1,9
	5N2H8	9,5	7,1

En negrita se remarcán los clones seleccionados de cada variante que presentaron mayor productividad celular.

10.2. PRODUCCIÓN DEL rhIFN- α 2b2N, rhIFN- α 2b3N, rhIFN- α 2b4N Y rhIFN- α 2b5N MEDIANTE EL CULTIVO DE LOS CLONES SELECCIONADOS EN CONDICIONES DE ADHERENCIA

La producción de las variantes hiperglicosiladas del rhIFN- α 2b se realizó en frascos T triples de 500 cm² de superficie, utilizando cultivos en fase estacionaria de crecimiento y realizando recambios cada 48 h o 72 h con medio de cultivo fresco suplementado con SFB 0,5% (V/V). Estas condiciones habían sido previamente optimizadas para el cultivo del clon D77N1C6, productor de la muteína con un sitio de *N*-glicosilación rhIFN- α 2bD77N. Las concentraciones de las diferentes muteínas en los sobrenadantes de cultivo obtenidos en esta escala fueron muy similares a las halladas en pequeña escala, repitiéndose el fenómeno de formación de cúmulos celulares durante el transcurso del cultivo.

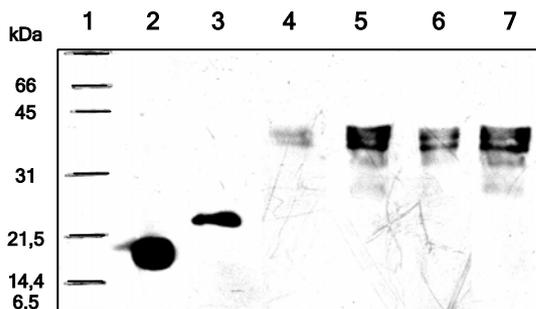


Fig. 49. Análisis del perfil de glicofomas de la muteína rhIFN- α 2b4N producida por diferentes clones celulares.

Los sobrenadantes obtenidos mediante el cultivo de los tres clones productores de la muteína rhIFN- α 2b4N de mayor productividad específica fueron analizados mediante técnica de *Western blot*. En la calle 1 se sembraron marcadores de masa molecular. En la calle 2 se sembraron 100 ng de estándar de rhIFN- α 2b no glicosilado. En la calle 3 se sembró un sobrenadante de cultivo conteniendo la citoquina *wild type*. En las calles 4, 5 y 6 se sembraron los sobrenadantes de cultivo correspondientes a los clones 4N2C8, 4N2F5 y 4N2F7, respectivamente. En la calle 7 se sembró el sobrenadante obtenido a partir de la transfección transitoria del rhIFN- α 2b4N.

10.3. PURIFICACIÓN DEL rhIFN- α 2b2N, rhIFN- α 2b3N, rhIFN- α 2b4N Y rhIFN- α 2b5N MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE INMUNOAFINIDAD

Teniendo en cuenta que ninguna de las mutaciones seleccionadas para la construcción de las variantes hiperglicosiladas del rhIFN- α 2b afectó la interacción de la citoquina con el mAb CA5E6, se utilizó el protocolo de purificación por inmunoadfinidad con dicho mAb, optimizado para la muteína rhIFN- α 2bD77N. Con este fin, se sembraron cantidades variables de sobrenadantes de cultivo conteniendo las diferentes muteínas en una columna XK 16/20 con 2 ml de matriz CA5E6-*Sepharose* (Tabla XXVI).

Se encuentra reportado que, para lograr una adsorción cuantitativa de solutos en una cromatografía de inmunoadfinidad, la constante de afinidad del ligando debe estar comprendida entre 10^5 y 10^6 M^{-1} . A menores constantes de asociación, el antígeno sólo es retardado en la matriz, requiriéndose una mayor longitud de la columna para alcanzar la separación deseada (Sofer y Hagel, 2001). La constante de afinidad del mAb CA5E6, calculada para la molécula no glicosilada, resultó de $2,2 \cdot 10^8$ M^{-1} (Casalis, 2004). Dadas las modificaciones introducidas en dicha molécula para obtener análogos glicosilados, es de esperar que la afinidad del ligando descienda conforme con el número de sitios incorporados. No obstante, independientemente de las potenciales modificaciones en la afinidad del ligando, no se observó pérdida de ninguna de las citoquinas glicosiladas en el *flowthrough* ni en los lavados en cantidades significativas durante el proceso de purificación. Incluso, los valores de recuperación calculados indicaron rendimientos cercanos al 100% en todas las purificaciones realizadas (Tabla XXVI).

En nuestro laboratorio, Amadeo (2003) realizó la purificación de rhEPO a partir de un sobrenadante de cultivo de células CHO recombinantes utilizando un mAb específico con una constante de afinidad de $5,8 \cdot 10^7$ M^{-1} . Sus experiencias demostraron una pérdida de la hormona en el *flowthrough* superior al 50%, utilizando flujos bajos e incluso en sistemas *batch*. En este caso, una constante de afinidad un orden superior a la considerada límite para el empleo de esta

tecnología no fue suficiente para capturar la proteína desde un sobrenadante de cultivo con una concentración de $7 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Por otra parte, Forno (2004), durante el desarrollo de experiencias de purificación de rhGM-CSF por inmunoafinidad, atribuyó la menor recuperación obtenida con uno de los mAbs evaluados a su menor constante de afinidad, la cual resultó de $1,1\cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$. Estos resultados subrayan la necesidad de constantes de afinidad elevadas para retener antígenos solubles desde una fase líquida y sugieren que, teniendo en cuenta los resultados exitosos obtenidos en nuestras experiencias, no se produjo un cambio de gran magnitud en la afinidad del mAb CA5E6 hacia los análogos del rhIFN- α 2b glicosilados. Las bajas concentraciones de las muteínas en los sobrenadantes de cultivo, cuestión que complica aún más la purificación de las mismas, apoyan esta hipótesis.

Tabla XXVI. Cálculo de la recuperación (R) de las muteínas del rhIFN- α 2b con un número variable de sitios de *N*-glicosilación purificadas mediante cromatografía de inmunoafinidad a la matriz CA5E6-*Sepharose*.

Muteína glicosilada	Etapas	Concentración (ng.ml ⁻¹)	Volumen (ml)	Masa (ng)	R (%)
rhIFN- α 2b2N	Siembra	80,4	504	40.521,6	-
	<i>Flowthrough</i>	0,3	504	151,2	0,4
	Lavado 1	35,1	10	351,0	0,9
	Lavado 2	19,5	10	195,0	0,5
	Elución	4.837,8	8,2	39.670,0	97,9
rhIFN- α 2b3N	Siembra	8,0	710	5.680,0	-
	<i>Flowthrough</i>	-	-	-	-
	Lavado 1	-	-	-	-
	Lavado 2	-	-	-	-
	Elución	344,8	15,8	5.447,8	95,9
rhIFN- α 2b4N	Siembra	26,8	400	10.720,0	-
	<i>Flowthrough</i>	-	-	-	-
	Lavado 1	6,6	10	60,0	0,6
	Lavado 2	8,6	10	60,0	0,6
	Elución	314,5	33,8	10.630,1	99,2
rhIFN- α 2b5N	Siembra	7,2	630	4.536,0	-
	<i>Flowthrough</i>	-	-	-	-
	Lavado 1	1,4	10	14,0	0,3
	Lavado 2	1,2	10	12,0	0,3
	Elución	237,3	18,8	4.461,2	98,4

La determinación de la concentración de las muteínas del rhIFN- α 2b en las diferentes fracciones del proceso de purificación se realizó mediante técnica de ELISA *sandwich*.

La pureza de todas las variantes del rhIFN- α 2b recuperadas de la matriz CA5E6-*Sepharose* fue analizada mediante técnica de SDS-PAGE en condiciones reductoras con posterior tinción argéntica. La determinación del porcentaje de pureza se realizó mediante densitometría de las bandas coloreadas, obteniéndose valores entre 75% y 88%. El principal

contaminante lo constituyó la seroalbúmina bovina proveniente del SFB utilizado como suplemento del medio de cultivo (resultados no mostrados).

Mediante ensayos de *Western blot* se observó que el perfil de glicofomas de todas las moléculas purificadas se conservó muy similar al correspondiente a las citoquinas presentes en el sobrenadante de cultivo (siembra) (Fig. 50). La actividad biológica específica antiviral estimativa (ya que la concentración se determinó por ELISA *sandwich*, debido a las bajas concentraciones de las citoquinas en los sobrenadantes de cultivo) también se conservó durante el proceso de purificación.

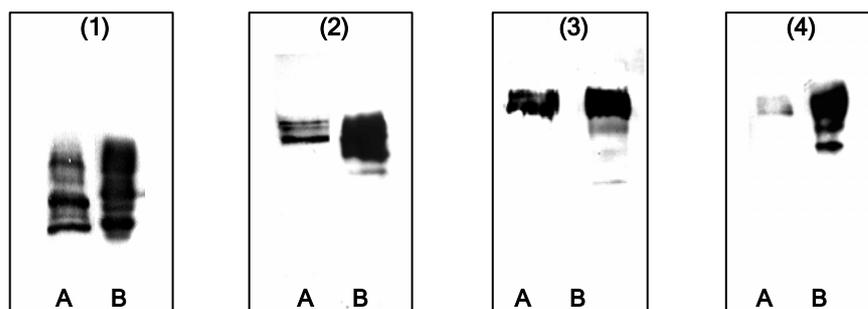


Fig. 50. Análisis de la calidad de las muteínas del rhIFN- α 2b con un número variable de sitios de *N*-glicosilación, purificadas por inmunoafinidad, mediante técnica de SDS-PAGE y *Western blot*.

Se analizaron las muestras correspondientes a la siembra (A) y a la elución concentrada y diafiltrada (B). Muteínas: (1) rhIFN- α 2b2N; (2) rhIFN- α 2b3N; (3) rhIFN- α 2b4N; (4) rhIFN- α 2b5N.

10.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE LAS VARIANTES DE rhIFN- α 2b PURIFICADAS MEDIANTE HPLC EN FASE REVERSA

El proceso de purificación por inmunoafinidad de las muteínas glicosiladas del rhIFN- α 2b se reiteró en diferentes ocasiones hasta obtener una cantidad suficiente de cada proteína para la realización de experimentos *in vivo*. Posteriormente, se mezclaron las fracciones correspondientes a la elución de las diferentes purificaciones y se determinó su concentración mediante técnica de ELISA *sandwich*, ELISA de competición (empleando en ambos casos el mAb CA5E6) y HPLC en fase reversa (RP-HPLC). Asimismo, se evaluaron las muestras purificadas correspondientes al rhIFN- α 2b *wild type* y al rhIFN- α 2b1N.

El objetivo de este ensayo fue comparar la cuantificación de las moléculas con diferentes metodologías: dos esquemas de enzoinmunoensayos y una técnica fisicoquímica independiente de interacciones inmunoquímicas. Resulta interesante correlacionar este último ensayo con una de las técnicas útiles para la determinación de las citoquinas en muestras complejas, ya que, de lo contrario, constantemente se requeriría la obtención de las mismas con un elevado grado de pureza y en alta concentración.

Como paso preliminar a la cuantificación de los derivados del rhIFN- α 2b por RP-HPLC, se determinó el tiempo de retención del principal contaminante, la seroalbúmina bovina, el cual fue aproximadamente de 33 min, 9 min distante del correspondiente al rhIFN- α 2b no glicosilado. La determinación de la concentración de las citoquinas se realizó utilizando una curva de calibración preparada con el estándar no glicosilado de rhIFN- α 2b.

El análisis de las muteínas glicosiladas del rhIFN- α 2b por RP-HPLC demostró diferentes perfiles cromatográficos según la identidad de la molécula. Se observó una disminución gradual

de los tiempos de retención conforme con la introducción de nuevos sitios de *N*-glicosilación. Probablemente, el incremento de la hidrofiliidad de las moléculas como consecuencia de la adición de hidratos de carbono permitiría su desorción de la matriz a concentraciones más bajas de solvente orgánico. Para el rhIFN- α 2b *wild type*, se observaron tres picos: uno de ellos, correspondiente a la citoquina no glicosilada, se produjo a los 42 min, en muy baja proporción; otro pico, de mayor área, se produjo a los 40,8 min, y correspondió a la citoquina con el sitio de *O*-glicosilación ocupado; el tercer pico, a los 33 min, fue identificado como la BSA contaminante. Para el rhIFN- α 2b1N también se observaron los picos correspondientes a la BSA y a la molécula no glicosilada, junto con un tercer pico más ancho, a los 40,4 min, que comprendió las moléculas *O*-glicosiladas, *N*-glicosiladas y *N*, *O*-glicosiladas. El cromatograma correspondiente a la proteína rhIFN- α 2b2N evidenció la desaparición del pico de la molécula no glicosilada, observándose el pico correspondiente a la BSA y tres picos a los 38,2, 38,8 y 40,4 min, que incluyeron moléculas con un grado de ocupación variable de los sitios y, probablemente, con una microheterogeneidad en los oligosacáridos unidos a dichos sitios. Para el resto de las muteínas, se observó, además del pico correspondiente a la BSA, un único pico ancho que no pudo ser resuelto en sus diferentes componentes mediante esta técnica. El tiempo de retención de cada pico se desplazó acorde a la presencia de nuevas estructuras glicosídicas, siendo de 38,6 min para el rhIFN- α 2b3N, 38,2 min para el rhIFN- α 2b4N y 37,5 min para el rhIFN- α 2b5N (Fig. 51).

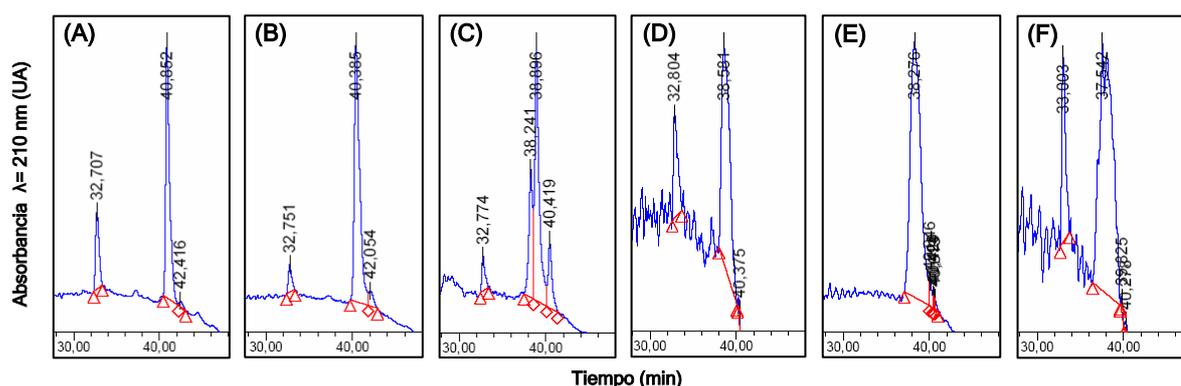


Fig. 51. Determinación de la concentración de las variantes glicosiladas del rhIFN- α 2b, purificadas por cromatografía de inmunoafinidad, mediante técnica de RP-HPLC.

Los cromatogramas representan la respuesta obtenida a $\lambda=210$ nm (en UA) en función del tiempo de retención (en minutos). Las muestras se evaluaron por duplicado frente a una curva estándar de rhIFN- α 2b no glicosilado. Muestras: (A) rhIFN- α 2b *wild type*; (B) rhIFN- α 2b1N; (C) rhIFN- α 2b2N; (D) rhIFN- α 2b3N; (E) rhIFN- α 2b4N; (F) rhIFN- α 2b5N.

La determinación de la concentración de las variantes del rhIFN- α 2b mediante las tres metodologías desarrolladas fue dispar (Tabla XXVII). La cuantificación del rhIFN- α 2b *wild type* fue el único caso donde los valores de concentración determinados por todas las técnicas coincidieron. Para el rhIFN- α 2b1N, la concentración hallada mediante el ensayo de ELISA competitivo se encontró dentro del rango determinado por RP-HPLC, no siendo así para la técnica *sandwich*. Para las muteínas con más de un sitio de *N*-glicosilación, se evidenció una tendencia a obtener valores de concentración mayores por RP-HPLC, seguidos por valores intermedios mediante el ensayo de ELISA competitivo y por concentraciones menores utilizando la técnica de ELISA *sandwich*.

Tabla XXVII. Determinación de la concentración de las variantes del rhIFN- α 2b purificadas mediante técnica de ELISA *sandwich*, ELISA de competición y RP-HPLC.

Variante del rhIFN- α 2b	rhIFN- α 2b ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		
	ELISA <i>sandwich</i>	ELISA competitivo	RP-HPLC
rhIFN- α 2b <i>wild type</i>	23,6 \pm 0,3	25,1 \pm 1,3	25,6 \pm 0,9
rhIFN- α 2b1N	6,5 \pm 0,1	8,4 \pm 1,3	9,6 \pm 0,9
rhIFN- α 2b2N	9,5 \pm 0,5	16,1 \pm 1,2	25,9 \pm 1,0
rhIFN- α 2b3N	1,1 \pm 0,1	3,6 \pm 0,3	9,7 \pm 0,4
rhIFN- α 2b4N	15,3 \pm 0,6	70,5 \pm 5,9	90,3 \pm 3,1
rhIFN- α 2b5N	1,6 \pm 0,2	7,2 \pm 0,5	30,4 \pm 5,6

La relación obtenida entre la concentración determinada por ambas técnicas inmunoquímicas se correlacionó con el grado de glicosilación de las muteínas del rhIFN- α 2b (Fig. 52A). Como se mencionó anteriormente, el ensayo de ELISA *sandwich* produjo una subvaloración de la concentración de las citoquinas *N*-glicosiladas, cuya magnitud, de acuerdo con los resultados obtenidos con el ensayo competitivo, aumentó conforme al número de sitios ocupados. Estas diferencias se atribuyen al requisito de doble reconocimiento del antígeno por el sistema a dos centros y a la restricción estérica que el mismo impone. En el ensayo competitivo este problema, en principio, es solucionado al participar un único epítopo de la molécula con la exigencia de ser reconocido en forma idéntica por el mAb, obteniéndose concentraciones más cercanas a las reales.

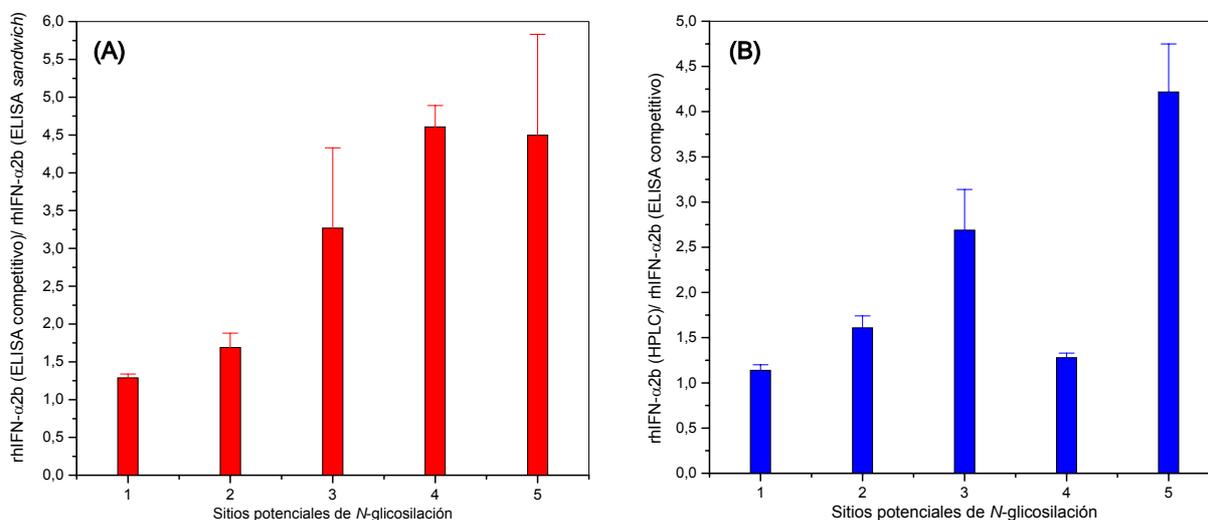


Fig. 52. Correlación entre las concentraciones obtenidas por diferentes métodos de cuantificación y el grado de glicosilación de las muteínas del rhIFN- α 2b.

Se graficó la relación entre las concentraciones obtenidas por ambos ensayos inmunoquímicos (A) y la relación entre la concentración obtenida por el ensayo competitivo y la determinada por RP-HPLC (B), en función del número de sitios potenciales de *N*-glicosilación.

No obstante, el ensayo competitivo también generó una subvaloración de la concentración de las moléculas con más de un sitio de *N*-glicosilación con respecto a los valores obtenidos por RP-HPLC (Fig.52B). Este resultado puede explicarse en base a la diferencia en la

afinidad puesta en juego cuando la molécula no glicosilada, inmovilizada en fase sólida, compite por su unión al mAb con la variante glicosilada que se quiere cuantificar, que se encuentra libre en solución. Es decir, la competencia se establece entre dos moléculas diferentes desde el punto de vista del contenido de hidratos de carbono, lo que influye en el comportamiento inmunoquímico. Así, pequeñas diferencias en la afinidad del mAb por ambas moléculas desplazarían el equilibrio hacia su interacción con la de mayor afinidad (en este caso rhIFN- α 2b no glicosilado). Por ello, la competencia será más equitativa cuando la afinidad del mAb hacia la molécula en solución sea lo más cercana a la afinidad hacia la molécula no glicosilada utilizada como estándar y Ag de sensibilización. Sin embargo, la magnitud de la variación entre la concentración determinada por este ensayo y la técnica fisicoquímica para las muteínas hiperglicosiladas no pudo correlacionarse directamente con el grado de glicosilación. Por ejemplo, mientras que para la variante rhIFN- α 2b3N el cociente entre la concentración determinada por HPLC y la concentración determinada por ELISA competitivo fue de 2,7, para la muteína rhIFN- α 2b4N este valor resultó de 1,3, aún cuando esta última contiene un mayor número de mutaciones y oligosacáridos que podrían interferir en la interacción con el anticuerpo. El hecho de que se desconozca la integridad del epítopo estructural que se encuentra involucrado en la interacción con el mAb en las proteínas con diferente grado de glicosilación impide una explicación racional de esta situación. Podría ocurrir que la estructura tridimensional de la molécula rhIFN- α 2b3N comprometa el reconocimiento del mAb en mayor medida que la estructura del rhIFN- α 2b4N. La presencia simultánea de determinadas mutaciones podría producir una reestructuración de la proteína que favorecería o perjudicaría su interacción con el mAb. La cromatografía en fase reversa es completamente independiente de interacciones de esta naturaleza, resultando más confiable a los fines de determinar la concentración de una citoquina cuando no se cuenta con un estándar idéntico a la misma.

La determinación de la potencia biológica de las preparaciones de las citoquinas purificadas se realizó mediante medición de su actividad biológica antiviral, según los requerimientos establecidos por la Farmacopea Europea (5ta edición, 2005). Este documento no especifica la determinación de la actividad antiproliferativa y, por lo tanto, todas las preparaciones comerciales se encuentran valoradas por su capacidad para inhibir la replicación viral, independientemente de su uso clínico. Haciendo uso de los resultados obtenidos por HPLC, se recalcularon los valores de actividad específica antiviral (Tabla XXVIII). Se observó que la actividad específica disminuyó con la adición de nuevos sitios de *N*-glicosilación o de nuevas mutaciones a la molécula.

Tabla XXVIII. Determinación de la actividad biológica específica antiviral de las variantes del rhIFN- α 2b utilizando los valores de concentración determinados por técnica de RP-HPLC.

Variante del rhIFN- α 2b	Actividad biológica específica antiviral (UI.ng ⁻¹)
rhIFN- α 2b <i>wild type</i>	161,7 \pm 4,9
rhIFN- α 2b1N	136,5 \pm 61,8
rhIFN- α 2b2N	70,7 \pm 15,7
rhIFN- α 2b3N	58,8 \pm 3,2
rhIFN- α 2b4N	20,7 \pm 3,9
rhIFN- α 2b5N	14,4 \pm 5,0

10.5. ANÁLISIS DE LAS ISOFORMAS DE LAS VARIANTES DEL rhIFN- α 2b MEDIANTE TÉCNICA DE ISOELECTROENFOQUE

El número de isoformas de las variantes glicosiladas del rhIFN- α 2b purificadas por inmunoafinidad fue analizado mediante focalización isoelectrica (Fig. 53).

La citoquina no glicosilada producida en *E. coli* consistió en una única banda de un punto isoelectrico cercano al límite superior del gradiente de pH (6,5), lo cual coincidió con los resultados publicados en la literatura (Kontsek, 1994).

El rhIFN- α 2b *wild type* evidenció la presencia de dos bandas correspondientes a isoformas O-glicosiladas con diferentes estructuras glicosídicas unidas a la porción proteica, no observándose bandas de proteína no glicosilada. Dado que la O-glicosilación es un evento post-traducciona, el hecho de que la Thr106 se encuentre expuesta en la superficie de la molécula (ASA > 50%) promovería una alta eficiencia de ocupación. Diferentes autores han descrito la estructura de los oligosacáridos unidos al hIFN- α 2 utilizando distintos sistemas de expresión. Adolf y col. (1991) demostraron la existencia de por lo menos cuatro especies glicosiladas del hIFN- α 2 producidas por leucocitos inducidos por el virus Sendai. La mayor proporción de las moléculas (75%) contenía el disacárido Gal β 1-3GalNAc (*core* tipo I, de acuerdo con Hounsell y col., 1996) ya sea sin sustituir o modificado con uno o dos residuos de ácido siálico, mientras que el resto de la población (25%) presentó el *core* de tipo II Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc, sustituido con un residuo de Gal. Resultados similares fueron reportados por Nyman y col. (1998b), quienes encontraron un 80% de moléculas que contenían el *core* tipo I de oligosacáridos (mono y disializados) y un 20% que portaban un monosialilpentasacárido de tipo II. En células de insecto, la estructura glicosídica predominante unida a la citoquina fue el disacárido Gal β 1-3-GalNAc y una fracción menor presentó sólo un residuo de GalNAc, no pudiéndose demostrar la capacidad de estas células para producir la sialidación de los carbohidratos (Sugiyama y col., 1993). Sin embargo, no existen evidencias claras acerca de la estructura de los O-glicanos del rhIFN- α 2b producido en células CHO. En algunos trabajos se menciona que la población mayoritaria sería aquella conteniendo el *core* tipo I disializado, y que las moléculas restantes llevarían el mismo *core* monosializado, lo cual se correlacionaría con las dos bandas observadas en el isoelectroenfoque, pese a que en nuestra experiencia ambas bandas se presentaron en proporciones similares.

La adición sucesiva de nuevos sitios de *N*-glicosilación resultó en la aparición de una nueva serie de isoformas con un menor punto isoeléctrico. Se observaron aproximadamente 4 bandas correspondientes a la variante rhIFN- α 2b1N, 8 bandas para la variante rhIFN- α 2b2N y 7 bandas para la variante rhIFN- α 2b3N, las cuales corresponderían a glicoformas con diferente grado de ocupación de los sitios y, a su vez, diferente grado de sialidación de las estructuras *N*-glicosídicas. El aumento del contenido de ácido siálico (que aporta cargas negativas a la molécula) debido a la presencia de más sitios de glicosilación y a la mayor antenaridad de las cadenas hidrocarbonadas se manifestó en la aparición de isoformas más ácidas. El isoelectroenfoco de los análogos rhIFN- α 2b4N y rhIFN- α 2b5N demostró una gran macro y microheterogeneidad de glicoformas, con un patrón de aproximadamente 16 y 18 bandas, respectivamente, la mayoría de las cuales se concentraron en la región más ácida del rango de pH. En el caso particular de la variante rhIFN- α 2b4N, las 16 bandas observadas podrían adjudicarse a la presencia de todos los niveles de sialidación posibles para las estructuras *N*-glicosídicas, correspondiendo a moléculas conteniendo entre 1 y 4 sitios ocupados, cada uno de los cuales podría portar entre 1 y 4 residuos de ácido siálico, debido a la existencia de estructuras mono, bi, tri y tetraantenarias. Alternativamente, la diferencia de carga entre isoformas adyacentes podría deberse a la presencia de uno o dos ácidos siálicos terminales de los *O*-glicanos.

Sin lugar a dudas, todos estos resultados necesitan ser confirmados con técnicas apropiadas para el estudio de las estructuras glicosídicas que componen cada variante, como por ejemplo, por espectrometría de masas.

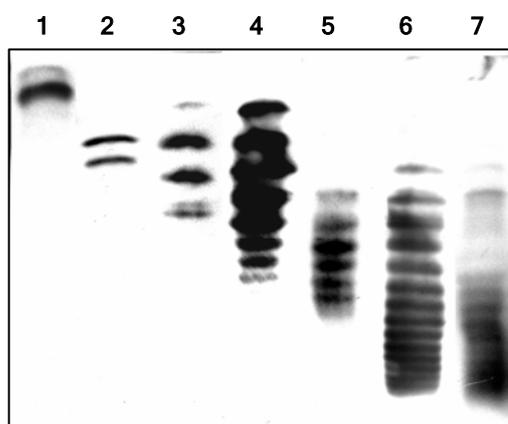


Fig. 53. Análisis del patrón de isoformas de los análogos del rhIFN- α 2b con un número variable de sitios de *N*-glicosilación mediante técnica de isoelectroenfoco y posterior *Western blot*.

El número de isoformas de las variantes de rhIFN- α 2b purificadas por inmunoafinidad fue analizado mediante focalización isoeléctrica, seguida de electrotransferencia a una membrana de PVDF y detección inmunológica.

Calles: 1: rhIFN- α 2b no glicosilado
2: rhIFN- α 2b *wild type*
3: rhIFN- α 2b1N
4: rhIFN- α 2b2N
5: rhIFN- α 2b3N
6: rhIFN- α 2b4N
7: rhIFN- α 2b5N

10.6. EVALUACIÓN DE LA FARMACOCINÉTICA DEL rhIFN- α 2b2N, rhIFN- α 2b3N, rhIFN- α 2b4N Y rhIFN- α 2b5N EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN UTILIZANDO LA VÍA SUBCUTÁNEA

En virtud de los resultados obtenidos previamente, que demostraron que la existencia de algún tipo de glicosilación puede modificar la vida media en circulación del rhIFN- α 2b, se evaluó la farmacocinética de los derivados de la citoquina conteniendo un número variable de sitios de *N*-glicosilación en animales de experimentación. El análisis se realizó en comparación con las tres moléculas estudiadas previamente (rhIFN- α 2b no glicosilado, rhIFN- α 2b *wild type* y rhIFN- α 2b1N, sección 6.4) y con un análogo comercial de la citoquina conjugado covalentemente a una molécula de polietilenglicol de 12 kDa (rhIFN- α 2b-PEG12kDa, Intron-A[®] PEG, Schering-Plough). El Intron-A[®] PEG se encuentra aprobado para el tratamiento de la hepatitis C crónica, solo o en combinación con ribavirina. Presenta un importante incremento en la vida media plasmática en comparación con la citoquina no modificada, permitiendo reducir el esquema tradicional de tres dosis semanales a una única inyección por semana (Wang y col., 2002).

De la misma manera que para las experiencias anteriores, se utilizaron lotes de tres animales cada uno, los cuales fueron inyectados por vía subcutánea con una dosis única de $5 \cdot 10^5$ UI.kg⁻¹ de peso corporal del animal de cada variante del rhIFN- α 2b purificada por inmunoadfinidad. El perfil de actividad biológica antiviral en plasma en función del tiempo para cada análogo del rhIFN- α 2b evaluado se muestra en la Fig. 54.

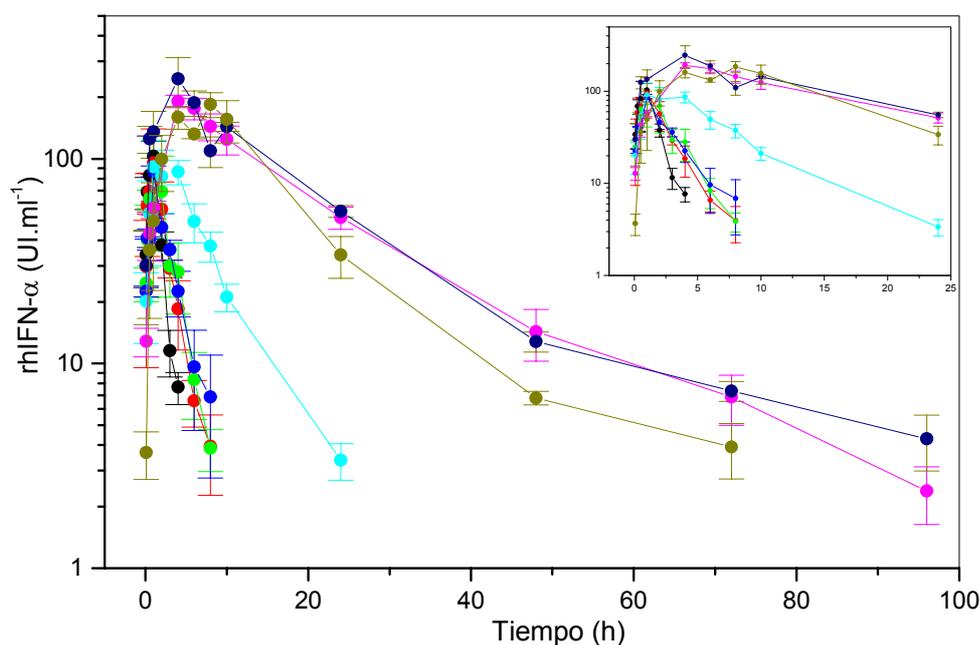


Fig. 54. Perfil farmacocinético de las muteínas del rhIFN- α 2b con un número variable de sitios de *N*-glicosilación luego de su inoculación subcutánea en animales de experimentación.

Se graficó la actividad biológica plasmática del rhIFN- α 2b no glicosilado (●), rhIFN- α 2b *wild type* (●), rhIFN- α 2b1N (●), rhIFN- α 2b2N (●), rhIFN- α 2b3N (●), rhIFN- α 2b4N (●), rhIFN- α 2b5N (●) y rhIFN- α 2bPEG12kDa (●), en el eje de ordenadas, en función del tiempo transcurrido desde la inyección, en el eje de abscisas. Los resultados se muestran como el valor promedio \pm SD (n=3). El gráfico insertado en la esquina superior derecha muestra los datos obtenidos entre 0 y 25 h.

El comportamiento de todas las variantes estudiadas luego de su inoculación subcutánea se ajustó a un modelo de absorción de primer orden con una rápida distribución corporal, por lo que la absorción y la eliminación se asumieron como procesos de primer orden. De acuerdo con este modelo, se calcularon los parámetros farmacocinéticos correspondientes (Tabla XXIX), los cuales se compararon utilizando el test *t* de Student o el ANOVA, según correspondiese, considerando la existencia de diferencias significativas entre muestras cuando $p < 0,05$.

Tabla XXIX. Parámetros farmacocinéticos de las variantes del rhIFN- α 2b con un número variable de sitios de *N*-glicosilación luego de su inyección subcutánea en ratas.

Variante del rhIFN- α 2b	$T_{m\acute{a}x}$ (h)	$C_{m\acute{a}x}$ (UI.ml ⁻¹)	$t_{1/2elim}$ (h)	AUC (UI.h.ml ⁻¹)	CL_{app} (ml.h ⁻¹)
rhIFN- α 2b no glicosilado	0,52 \pm 0,07	123,5 \pm 38,8	0,64 \pm 0,12	189,5 \pm 16,5	530,3 \pm 44,5
rhIFN- α 2b <i>wild type</i>	0,78 \pm 0,12	77,9 \pm 21,8	1,38 \pm 0,33	178,4 \pm 1,0	560,5 \pm 3,1
rhIFN- α 2b1N	0,99 \pm 0,18	61,5 \pm 6,8	1,68 \pm 0,05	214,1 \pm 52,5	489,5 \pm 137,3
rhIFN- α 2b2N	1,13 \pm 0,26	55,4 \pm 11,8	1,91 \pm 0,06	240,5 \pm 25,3	418,6 \pm 41,5
rhIFN- α 2b3N	1,87 \pm 0,54	87,0 \pm 15,3	4,34 \pm 0,27	761,3 \pm 66,0	132,0 \pm 10,9
rhIFN- α 2b4N	6,36 \pm 0,85	126,7 \pm 3,4	14,57 \pm 0,78	3.760,3 \pm 236,8	26,7 \pm 1,7
rhIFN- α 2b5N	2,83 \pm 0,94	163,6 \pm 25,7	15,94 \pm 1,30	4.251,0 \pm 286,0	23,6 \pm 1,5
rhIFN- α 2bPEG12kDa	4,74 \pm 1,29	139,8 \pm 19,5	11,39 \pm 0,75	3.261,5 \pm 205,8	30,7 \pm 2,0

Los parámetros fueron calculados para cada animal y se expresan como el valor promedio \pm SD (n=3).

Como se describió anteriormente, la actividad biológica máxima en plasma del rhIFN- α 2b no glicosilado y del rhIFN- α 2b *wild type* se alcanzó a las 0,52 \pm 0,07 h y 0,78 \pm 0,12 h post-inyección, respectivamente, mientras que la actividad plasmática máxima de los análogos *N*-glicosilados se registró en tiempos posteriores, que se incrementaron progresivamente con la adición de nuevos sitios de *N*-glicosilación. Estos resultados indican que la fase inicial de distribución de la citoquina se extendería debido a la presencia de carbohidratos de tipo N, a causa de una menor velocidad de absorción desde el sitio de inyección hacia la circulación. No obstante, teniendo en cuenta que el nivel plasmático máximo de la muteína rhIFN- α 2b5N se obtuvo en forma previa que para la variante rhIFN- α 2b4N, (2,83 \pm 0,94 h y 6,38 \pm 0,85 h post-administración, respectivamente, $p=8,10 \cdot 10^{-3}$), podrían existir diferencias en las características de absorción de las moléculas no relacionadas exclusivamente con el número de cadenas de oligosacáridos adicionadas. Alternativamente, las diferencias encontradas entre estas dos variantes podrían deberse a errores experimentales, que derivan del cálculo teórico del $T_{m\acute{a}x}$, sin considerar los valores máximos encontrados en las muestras reales.

Dependiendo de la vía de administración, el proceso de absorción de una droga exige su paso a través de diferentes membranas biológicas. Tanto la velocidad de absorción como la fracción absorbida dependen de las características fisicoquímicas del fármaco, de las características del preparado farmacéutico (sólido, suspensión, etc.) y de factores fisiológicos del paciente. Entre las características fisicoquímicas que influyen sobre la velocidad de transporte a través de las membranas celulares se encuentran el peso molecular, la liposolubilidad y el grado de ionización de la droga. Una molécula liposoluble, débilmente ionizada y de bajo peso molecular se absorberá rápidamente hacia la circulación sanguínea (Galinsky y Svensson, 1995).

En consecuencia, es factible que el agregado de carbohidratos, los cuales incrementan tanto el tamaño como la carga de la citoquina, resulte en una prolongación del proceso de absorción en comparación con su análogo no glicosilado. De la misma manera, la composición de los hidratos de carbono de las cadenas unidas a través de un enlace *N*-glicosídico, que pueden comprender estructuras de diferente antenaridad y, por ende, diferente contenido de residuos de ácido siálico, puede afectar las características de absorción de una molécula. En relación a esto, es interesante destacar que la posición de un sitio de *N*-glicosilación puede influenciar la naturaleza de las estructuras de carbohidratos que pueden ser adicionadas. Por ejemplo, los oligosacáridos unidos en la Asn24 de la molécula de rhEPO tienden a ser de menor tamaño que aquéllos unidos a la Asn83 o a la Asn38 (Sinclair y Elliot, 2005).

Como se expuso anteriormente, la eliminación completa del rhIFN- α 2b no glicosilado de la circulación se produjo a las 4 h post-administración; en cambio, las citoquinas *wild type*, rhIFN- α 2b1N y rhIFN- α 2b2N pudieron detectarse hasta las 8 h post-inyección. No obstante, no se encontraron diferencias significativas en el *clearance* sistémico aparente de las cuatro moléculas mencionadas ($p=0,19$), si bien la presencia de glicosilación (ya sea de tipo N o tipo O) produjo un modesto incremento del tiempo de vida media de eliminación. Sólo luego de la adición del tercer sitio de *N*-glicosilación, el comportamiento farmacocinético de la proteína se vio modificado en forma significativa. Así, la remoción total de la circulación del rhIFN- α 2b3N se registró a las 24 h luego de la inyección, con un $t_{1/2elim}$ 6,8 veces superior y un CL_{app} 4 veces inferior con respecto a los mismos parámetros correspondientes a la citoquina no glicosilada ($p=2,70 \cdot 10^{-5}$ y $p=1,13 \cdot 10^{-4}$, respectivamente). Por otra parte, mientras que la eliminación de la muteína rhIFN- α 2b3N comenzó a las 4 h post-inyección, el máximo nivel de actividad plasmática alcanzado por las variantes rhIFN- α 2b4N y rhIFN- α 2b5N se mantuvo prácticamente constante hasta las 10 h, comenzando luego su disminución gradual hasta alcanzar valores no detectables a las 96 h luego de la administración. Ambos análogos hiperglicosilados mostraron un incremento de aproximadamente 25 veces en el $t_{1/2elim}$ comparado con la molécula no glicosilada ($p=1,21 \cdot 10^{-6}$), no observándose diferencias significativas entre ellos ($p=0,19$). La disminución de la velocidad de eliminación de las variantes con 4 y 5 sitios de *N*-glicosilación fue consistente con el mayor área bajo la curva concentración versus tiempo (AUC) y, consecuentemente, con su menor *clearance* sistémico. De esta manera, el CL_{app} se redujo aproximadamente 20 veces a causa de la adición de cuatro y cinco sitios de *N*-glicosilación a la molécula nativa. Ambas variantes se comportaron de la misma manera desde el punto de vista farmacocinético, lo que concuerda con el hecho de que sus perfiles de masa molecular y composición de isoformas fueron muy similares.

Más allá de que los resultados encontrados luego de la aplicación de esta estrategia de glicoingeniería al rhIFN- α 2b son de por sí exitosos, su comparación con el comportamiento farmacocinético del Intron-A[®] PEG, un derivado de la citoquina aprobado para el tratamiento de la hepatitis C crónica que se administra en dosis menos frecuentes gracias a su menor *clearance* plasmático, los hacen aún más atrayentes. La fase de absorción y distribución del rhIFN- α 2b-PEG12kDa fue muy similar a la correspondiente a las moléculas rhIFN- α 2b4N y rhIFN- α 2b5N. Contrariamente, la eliminación de la citoquina pegilada del torrente sanguíneo se produjo con una velocidad levemente mayor, obteniéndose un $t_{1/2elim}$ entre 0,8 y 0,7 veces inferior con respecto a los valores hallados para las variantes rhIFN- α 2b4N y rhIFN- α 2b5N, respectivamente ($p=3,31 \cdot 10^{-3}$). Además, la actividad biológica plasmática del rhIFN- α 2b-PEG12kDa en las muestras extraídas a las 24, 48 y 72 h post-inyección fue significativamente menor con respecto a los valores obtenidos para ambas muteínas

hiperglicosiladas, alcanzándose valores no detectables luego de las 72 h post-administración. La diferencia entre los niveles plasmáticos hallados en los tiempos tardíos del experimento determinó que el *clearance* aparente de la citoquina conjugada a la molécula de PEG de 12 kDa sea 1,1 y 1,3 veces mayor con respecto al de las muteínas con cuatro y cinco sitios de *N*-glicosilación, respectivamente ($p=6,85 \cdot 10^{-3}$). De esta manera, la adición de sitios potenciales de *N*-glicosilación permitió obtener variantes del rhIFN- α 2b con características farmacocinéticas levemente mejoradas con respecto a las de la citoquina comercial pegilada.

El hecho de que las diferencias entre la cinética *in vivo* del rhIFN- α 2b-PEG12kDa y las variantes rhIFN- α 2b4N y rhIFN- α 2b5N, aunque estadísticamente significativas, fueron mínimas, no debe considerarse como un fracaso de la estrategia aplicada. Por el contrario, demuestra que la glicoingeniería puede ser una opción muy atractiva para la mejora de las propiedades farmacocinéticas de proteínas con corta vida media en circulación, comparable a una tecnología aplicada exitosamente a numerosas proteínas como la pegilación. Por otra parte, esta estrategia podría presentar potenciales ventajas, considerando que los azúcares no sólo poseen un importante rol en la determinación de la vida media plasmática sino que afectan otras propiedades de las glicoproteínas, pudiendo mejorar su eficacia terapéutica mediante un aumento de su estabilidad y solubilidad o una disminución de su inmunogenicidad. Por ejemplo, la presencia de anticuerpos contra una proteína terapéutica limita su utilidad, ya sea debido a la neutralización de su actividad y reducción de su tiempo de residencia en circulación o por la producción de reacciones alérgicas (Fernandes y Gregoriadis, 2001). La ausencia de anticuerpos anti-darbopoyetina (rhEPO modificada mediante la adición de sitios de *N*-glicosilación) en pacientes que han recibido el tratamiento puede explicarse tanto por un aumento de la solubilidad y estabilidad de la proteína, que reduce la formación de agregados inmunogénicos, como por el encubrimiento de epitopes antigénicos, ambos efectos mediados por la presencia de carbohidratos adicionales (Sinclair y Elliot, 2005).

Los resultados obtenidos demuestran que la adición de carbohidratos al rhIFN- α 2b mejora sus propiedades farmacocinéticas. Sin embargo, este efecto no es directamente proporcional con respecto al número y tamaño de las cadenas adicionales, ya que la citoquina *O*-glicosilada, con uno y con dos sitios de *N*-glicosilación poseen parámetros farmacocinéticos similares. Weenen y col. (2004) reportaron un resultado similar cuando estudiaron el efecto de alterar el número y el tipo de hidratos de carbono adicionales en la molécula de FSH. Estos autores encontraron un valor máximo de $t_{1/2elim}$ que no pudo ser superado por el agregado de un mayor contenido de glúcidos a la hormona. En el caso del rhIFN- α 2b, la adición de un quinto sitio de *N*-glicosilación provocó un leve desplazamiento de la proporción de isoformas hacia la región más ácida del gradiente de pH con respecto a la molécula rhIFN- α 2b4N (Fig. 53), sin evidenciar cambios significativos en los parámetros farmacocinéticos *in vivo*.

Como se hizo referencia en diversas oportunidades en este manuscrito, la estrategia de glicoingeniería ha sido utilizada exitosamente para alterar el tiempo de residencia en circulación de otras proteínas terapéuticas. El ejemplo más conocido es el de la darbopoyetina o NESP, una variante de la rHuEPO que posee dos sitios adicionales de *N*-glicosilación y una vida media terminal en ratas aproximadamente tres veces superior que la de la hormona no modificada. En humanos, se observó un incremento similar en la vida media de la proteína, permitiendo una menor frecuencia de administración con respecto a la de la rhEPO nativa (MacDougall y col., 1999). Por otra parte, esta tecnología se aplicó a la hormona folículo-estimulante (FSH) mediante la unión de una extensión *N*-terminal con dos sitios de *N*-glicosilación. La molécula resultante, denominada FSH1208, también presentó un aumento de la vida media terminal de tres veces, lo

cual se tradujo en una acción terapéutica más potente en ratas (Perlmann y col., 2003). Otro grupo de investigadores realizó mutaciones puntuales en la estructura polipeptídica de la FSH para introducir hasta cuatro sitios adicionales de *N*-glicosilación, alcanzándose un tiempo de vida media de eliminación sólo dos veces mayor que el de la hormona no modificada (Weenen y col., 2004).

Nuestros resultados en modelos animales son altamente positivos y proyectan un potencial beneficio para la terapia humana, puesto que es razonable pensar que un incremento de 25 veces en la vida media *in vivo* del rhIFN- α 2b por la adición de cuatro sitios potenciales de *N*-glicosilación también podría producirse en seres humanos. El perfil farmacocinético favorable de la muteína hiperglicosilada rhIFN- α 2b4N podría traducirse en una mayor eficacia terapéutica, que ofrecería el beneficio de una menor frecuencia de administración y, en consecuencia, una disminución de los efectos colaterales indeseados en comparación con la citoquina no modificada.

Como se mencionó anteriormente, la mejora farmacocinética obtenida gracias a la aplicación de una estrategia de glicoingeniería podría explicarse por diversos mecanismos. La reducción del *clearance*, particularmente para proteínas pequeñas, se puede lograr previniendo la filtración glomerular (Sheffield, 2001). La barrera del glomérulo discrimina tanto en base al tamaño molecular como a la carga, ambas propiedades completamente modificadas por la adición de carbohidratos (Gooche y col., 1992). Adicionalmente, si uno de los principales mecanismos de eliminación de una proteína es la endocitosis mediada por receptor, la disminución de la afinidad hacia al receptor que evidencian las proteínas glicosiladas con respecto a su contraparte no glicosilada puede ser de utilidad para prolongar su acción *in vivo* (Koury, 2003). De esta manera, la disminución de la actividad biológica *in vitro* de la citoquina rhIFN- α 2b4N, que se atribuiría a una reducción de la afinidad hacia el receptor por impedimento estérico o por la carga que aportan los glúcidos, podría ser beneficiosa para mantener una concentración estable de la molécula en plasma durante un período de tiempo mayor. Por otra parte, los hidratos de carbono pueden tener un papel muy importante en la protección contra la acción de las enzimas proteolíticas extracelulares mediante un enmascaramiento de los sitios de clivaje, inhibiendo el mecanismo de eliminación de proteínas de la circulación sanguínea debido a inactivación por proteasas séricas (Jenkins y Curling, 1994). Dado que se ha reportado que las principales rutas de eliminación del hIFN- α 2b del plasma incluyen la proteólisis, la endocitosis mediada por receptor y la filtración renal (Peleg-Shulman y col., 2004), esta citoquina se presentó como el candidato ideal para la aplicación de la tecnología de glicoingeniería, lo cual quedó demostrado en este trabajo por los dramáticos cambios observados en su perfil farmacocinético.

10.7. EVALUACIÓN DE LA FARMACOCINÉTICA DEL rhIFN- α 2b NO GLICOSILADO, rhIFN- α 2b1N Y rhIFN- α 2b4N EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN UTILIZANDO LA VÍA ENDOVENOSA

La influencia de los carbohidratos sobre la farmacocinética del rhIFN- α 2b fue estudiada utilizando la vía de inoculación intravascular, con el fin de eliminar la contribución del proceso de absorción desde el sitio de administración hacia el torrente sanguíneo. Lotes de cuatro animales cada uno fueron inyectados en la vena de la cola con una dosis única de 1 μ g por rata de un grupo selecto de derivados de la citoquina: rhIFN- α 2b no glicosilado, rhIFN- α 2b1N, rhIFN- α 2b4N y rhIFN- α 2b-PEG12kDa. La cuantificación de la proteína en el plasma correspondiente a los distintos tiempos post-inyección se realizó mediante valoración de su actividad biológica antiviral

volumétrica. El porcentaje de actividad biológica remanente con respecto a la dosis suministrada a cada animal se graficó en función del tiempo transcurrido desde la administración.

El perfil bifásico de actividad plasmática en el tiempo obtenido para todas las moléculas analizadas permitió ajustar el comportamiento de las mismas a un modelo de dos compartimientos, con una fase de distribución (remoción desde el compartimiento central hacia el compartimiento periférico) y una fase de eliminación (depuración hacia el exterior del organismo) claramente distinguibles (Fig. 55). Los parámetros que caracterizan la cinética *in vivo* de las moléculas mediante esta vía de administración se muestran en la Tabla XXX. También se indica la biodisponibilidad sistémica porcentual (F%) de las variantes luego de su administración subcutánea, la cual se calculó teniendo en cuenta los datos obtenidos luego de su inyección endovenosa.

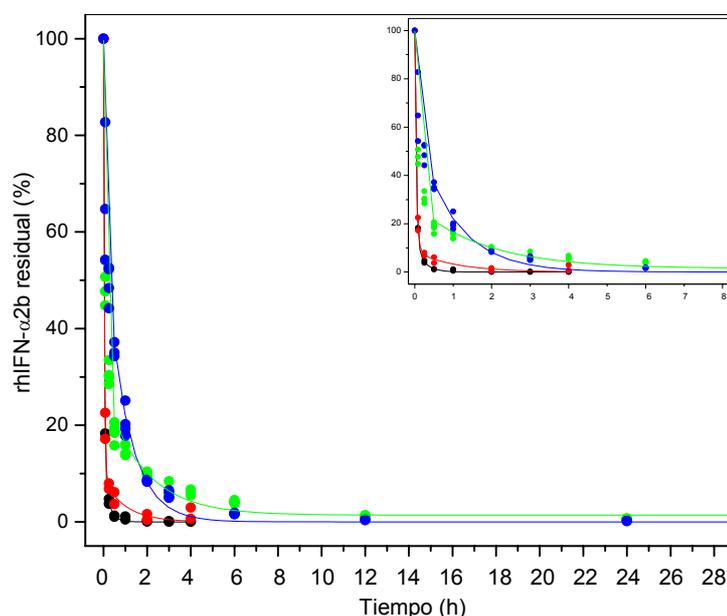


Fig. 55. Perfil farmacocinético de diferentes variantes del rhIFN- α 2b luego de su inoculación endovenosa en animales de experimentación.

Se graficó la actividad biológica remanente en plasma (calculada como el porcentaje de la actividad biológica inicial), en el eje de ordenadas, en función del tiempo transcurrido desde la inyección, en el eje de abscisas. Muestras: rhIFN- α 2b no glicosilado (●), rhIFN- α 2b1N (●), rhIFN- α 2b4N (●) y rhIFN- α 2bPEG12kDa (●). Se muestran los resultados individuales ($n=4$) y la curva de ajuste de acuerdo con el modelo de dos compartimientos. El gráfico representado en la esquina superior derecha muestra los datos obtenidos entre 0 y 8 h.

El rhIFN- α 2b no glicosilado fue depurado de la circulación más rápidamente que la citoquina rhIFN- α 2b4N tanto en la fase de distribución como en la fase de eliminación. El tiempo de vida media de distribución ($t_{1/2\alpha}$) del análogo hiperglicosilado fue aproximadamente 4 veces superior al de la proteína producida en *E. coli* ($p=6,21 \cdot 10^{-3}$), mientras que el tiempo de vida media de eliminación ($t_{1/2\beta}$) mostró un incremento de 12 veces ($p=8,99 \cdot 10^{-4}$). Contrariamente, no se detectaron diferencias significativas entre el $t_{1/2\alpha}$ de la muteína rhIFN- α 2b1N en comparación con la citoquina no glicosilada ($p=0,89$), ni tampoco en el $t_{1/2\beta}$ ($p=0,10$). Estos resultados se condicen con el modesto incremento del $t_{1/2elim}$ causado por la adición de un sitio de *N*-glicosilación a la proteína producida en bacterias observado en los experimentos por vía subcutánea.

Mientras que la actividad biológica plasmática del rhIFN- α 2b no glicosilado y del rhIFN- α 2b1N se aproximó al nivel basal luego de las 4 h post-inyección, la actividad del rhIFN- α 2b4N continuó disminuyendo hasta las 12 h luego de la administración, siendo aún detectable a las 29 h. El mayor tiempo de residencia en plasma de la citoquina hiperglicosilada fue consistente con su menor *clearance* (CL) plasmático, que se redujo 8,5 veces en comparación con el correspondiente a la citoquina no modificada ($p=1,05 \cdot 10^{-3}$). Por el contrario, al igual que para la ruta de administración extravascular, no se encontraron diferencias apreciables entre el CL plasmático de la molécula no modificada con respecto a la variante rhIFN- α 2b1N ($p=0,59$). Mediante la vía de administración intravascular se confirmaron los resultados hallados por vía subcutánea, que indican que la presencia de *N*-glicanos ejerce un efecto positivo sobre el comportamiento farmacocinético del rhIFN- α 2b. Sin embargo, nuevamente se destaca la idea de que un mínimo contenido de glúcidos podría ser un requerimiento necesario para eludir los mecanismos mediante de depuración de la citoquina.

Un comentario aparte merece la comparación entre la proteína hiperglicosilada y la proteína pegilada, que comparten la característica de exhibir una mejora farmacocinética pero difieren en la tecnología utilizada para alcanzarla. Si bien ambas moléculas presentaron una mayor exposición sistémica que su contraparte no modificada, su comportamiento farmacocinético mostró importantes diferencias. La distribución del rhIFN- α 2b-PEG12kDa se extendió durante un período de tiempo más prolongado que la correspondiente al rhIFN- α 2b4N, lo cual quedó demostrado por su mayor $t_{1/2\alpha}$ ($0,45 \pm 0,09$ h versus $0,24 \pm 0,04$ h, respectivamente, $p=6,15 \cdot 10^{-3}$). De forma opuesta, la eliminación del rhIFN- α 2b4N se produjo en forma más lenta, con un $t_{1/2\beta}$ que, si bien no fue significativamente mayor al del rhIFN- α 2b-PEG12kDa ($p=0,16$), determinó que su *clearance* plasmático fuese 0,7 veces inferior con respecto al del análogo pegilado ($p=2,67 \cdot 10^{-3}$). Podría decirse que la prolongación del proceso de distribución hacia los tejidos periféricos del rhIFN- α 2b-PEG12kDa se compensa con la extensión del proceso de eliminación del rhIFN- α 2b4N, obteniéndose diferencias modestas entre el *clearance* de ambas moléculas.

Tabla XXX. Parámetros farmacocinéticos de diferentes variantes del rhIFN- α 2b luego de su inyección endovenosa en ratas.

Variante del rhIFN- α 2b	$t_{1/2\alpha}$ (h)	$t_{1/2\beta}$ (h)	CL (ml.h ⁻¹)	(VD) _{ss} (ml)	F* (%)
rhIFN- α 2b no glicosilado	0,06 \pm 0,02	0,58 \pm 0,19	169,80 \pm 40,26	93,28 \pm 20,55	33,6 \pm 10,7
rhIFN- α 2b1N	0,06 \pm 0,04	1,45 \pm 0,47	148,86 \pm 22,62	132,96 \pm 19,52	31,2 \pm 15,1
rhIFN- α 2b4N	0,24 \pm 0,04	6,99 \pm 0,96	19,86 \pm 3,51	136,05 \pm 22,88	71,5 \pm 5,4
rhIFN- α 2bPEG12kDa	0,45 \pm 0,09	6,03 \pm 0,69	29,20 \pm 1,40	82,00 \pm 21,71	94,6 \pm 6,6

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

*Biodisponibilidad porcentual luego de la inoculación por vía subcutánea.

El volumen de distribución en fase estacionaria (VD_{SS}) de las variantes glicosiladas (rhIFN- α 2b1N y rhIFN- α 2b4N) fue similar al de la proteína no glicosilada ($p=0,19$ y $p=0,10$, respectivamente), lo que sugiere que la glicosilación no afecta la distribución de la citoquina por fuera del compartimento vascular. La unión covalente de una molécula de PEG de 12 kDa al rhIFN- α 2b tampoco manifestó un cambio significativo en el VD_{SS} ($p=0,65$), indicando que la citoquina pegilada se distribuye por el espacio extracelular de manera semejante a la proteína no modificada. La influencia de la glicosilación o de la pegilación sobre el VD_{SS} no se encuentra bien

establecida. Mientras que la conjugación a una estructura trimérica de PEG de 43 kDa no afecta la biodistribución del rhIFN- α 2a (Jo y col., 2006), la unión a una molécula de PEG ramificada de 40 kDa determina que el VD_{SS} del PEGASYS® sea aproximadamente 5 veces inferior al de la proteína producida en bacterias, haciendo que la molécula permanezca en la circulación y en órganos altamente irrigados durante períodos de tiempo prolongados (Matthews y McCoy, 2004). De la misma manera, el acoplamiento de una molécula lineal de PEG de 20 kDa tanto al rhIFN- β humano (Pepinsky y col., 2001) como murino (Arduini y col., 2004) produce una disminución de dos veces en el VD_{SS} de la citoquina bacteriana. Por otra parte, si bien no se han reportado cambios en el VD_{SS} de la darbopoyetina con respecto al de la eritropoyetina *wild type* (MacDougall y col., 1999) ni en el VD_{SS} del IGFBP-6 O-glicosilado comparado con el de su contraparte no glicosilada (Marinaro y col., 2000), la glicosilación influye sobre la distribución de la interleuquina-3 glicosilada (gIL-3). Se ha sugerido que los carbohidratos atrapan a la gIL-3 dentro de los tejidos mediante su unión a la matriz extracelular, lo cual aumenta su VD_{SS} y provoca su liberación lenta hacia la circulación, prolongando su vida media *in vivo* (Sinclair y Elliot, 2005).

La biodisponibilidad (F%) subcutánea de la variante rhIFN- α 2b1N no mostró diferencias con la correspondiente al rhIFN- α 2b en relación a la misma dosis inyectada por vía endovenosa ($31,2 \pm 15,1\%$ versus $33,6 \pm 10,7\%$, respectivamente, $p=0,87$). Por el contrario, más de un 70% de la variante hiperglicosilada rhIFN- α 2b4N se encontró biodisponible luego de su inyección subcutánea. Esto sugiere que la presencia de glicosilación modifica las características fisicoquímicas de la molécula, favoreciendo que una mayor fracción de la misma llegue al plasma sanguíneo para cumplir su efecto farmacológico luego de su administración por una ruta extravascular. Asimismo, la biodisponibilidad de la variante pegilada rhIFN- α 2b-PEG12kDa también se mostró incrementada con respecto a la de la molécula no modificada, sin que las diferencias encontradas con la muteína rhIFN- α 2b4N sean estadísticamente significativas para los niveles de probabilidad establecidos ($p=0,08$).

Mediante esta vía de administración se corroboraron los resultados obtenidos previamente, los cuales demuestran que la estrategia de glicoingeniería podría ser una tecnología aplicable en forma general para mejorar diversas propiedades de proteínas terapéuticas.

11. ESTUDIO DE LA VARIANTE CON CUATRO SITIOS DE N-GLICOSILACIÓN rhIFN- α 2b4N

11.1. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL rhIFN- α 2b4N A MAYOR ESCALA

Considerando que la adición de un quinto sitio de N-glicosilación al rhIFN- α 2b no produjo cambios importantes en su comportamiento farmacocinético con respecto al de la citoquina con cuatro sitios de N-glicosilación sino que, por el contrario, produjo un descenso de su actividad biológica específica antiviral así como antiproliferativa, la citoquina rhIFN- α 2b4N fue seleccionada para su estudio más exhaustivo.

Por lo tanto, con el fin de obtener la masa requerida para experimentos de diferente naturaleza, el clon 4N2F5 fue cultivado en una escala mayor, utilizando un número superior de frascos T triples de 500 cm² de superficie (200 ml de medio de cultivo) o, alternativamente, botellas *roller* de 1.700 cm² (superficie extendida, 500 ml de medio de cultivo). La producción se llevó a cabo respetando las condiciones establecidas previamente. La concentración del rhIFN- α 2b4N alcanzada mediante el cultivo en frascos *roller* (determinada por técnica de ELISA

sandwich) varió entre 7 ng.ml⁻¹ y 27 ng.ml⁻¹, mientras que la concentración obtenida en frascos T triples osciló entre 33 ng.ml⁻¹ y 60 ng.ml⁻¹. En ambos sistemas de cultivo en adherencia se reiteró el fenómeno de formación de cúmulos de células perceptibles macroscópicamente. La agitación aplicada en el sistema rotativo produjo el desprendimiento y la posterior eliminación de dichos agregados celulares en los recambios de medio de cultivo, lo cual probablemente sea la causa de que la concentración de la citoquina producida fuese menor que la obtenida en el sistema estático.

Todas las cosechas de sobrenadantes de cultivo conteniendo el rhIFN- α 2b4N fueron purificadas por cromatografía de inmunoafinidad al mAb CA5E6. Considerando el volumen de material a purificar, el proceso fue escalado mediante la preparación de una nueva matriz inmunoabsorbente. Para ello, se acoplaron 42,6 mg de mAb purificado a 15 ml de matriz de *Sepharose* 4B activada con bromuro de cianógeno, obteniéndose una eficiencia de acoplamiento de un 99,8%. La capacidad teórica de unión de la resina CA5E6-*Sepharose* fue de 18,9 nmol de rhIFN- α 2b por ml de gel, la cual se puede expresar como una capacidad teórica total de 5,4 mg de rhIFN- α 2b no glicosilado. La matriz fue empaquetada en una columna XK 26/20 (GE Healthcare), de mayor diámetro interno que la utilizada previamente, lo que permitió aumentar el flujo volumétrico de siembra a 4 ml.min⁻¹ y el de los pasos de lavado y elución a 2 ml.min⁻¹, siempre respetando el flujo lineal máximo para este tipo de resina (1,25 cm.min⁻¹). Se llevaron a cabo varios procedimientos de purificación en los cuales se sembraron aproximadamente 1.200 ml de sobrenadante de cultivo, obteniéndose recuperaciones que oscilaron entre 90% y 100%. La pureza de todas las eluciones fue analizada mediante técnica de SDS-PAGE en condiciones reductoras con posterior tinción argéntica, obteniéndose valores cercanos al 95%. El perfil de isoformas presente en las eluciones se conservó idéntico al correspondiente al rhIFN- α 2b4N sembrado, como se evidenció en ensayos de isoelectroenfoque (Fig. 56), y la actividad biológica específica antiviral también se preservó a lo largo del proceso de purificación (resultados no mostrados).

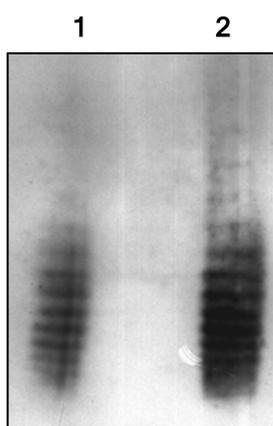


Fig. 56. Análisis del patrón de isoformas del rhIFN- α 2b4N mediante técnica de isoelectroenfoque y posterior *Western blot*.

En la calle 1 se sembró un sobrenadante obtenido a partir del cultivo del clon 3D2F5, productor del rhIFN- α 2b4N, el cual fue previamente concentrado y desalado. En la calle 2 se sembró el rhIFN- α 2b4N purificado por inmunoafinidad.

La concentración del *pool* de las eluciones correspondientes a las diferentes purificaciones realizadas fue determinada por RP-HPLC, obteniéndose un valor de

$0,425 \pm 0,035 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Además, la concentración de la citoquina hiperglicosilada purificada se determinó mediante espectrofotometría, utilizando los datos de lectura de absorbancia a $\lambda=280 \text{ nm}$ de acuerdo con la ecuación 5. El resultado obtenido fue similar al determinado por RP-HPLC ($0,480 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), lo cual indica que la técnica fisicoquímica desarrollada es confiable para la medición de la concentración de muestras de las diferentes variantes del rhIFN- α 2b.

11.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA ANTITUMORAL *IN VIVO* DEL rhIFN- α 2b4N EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

La interacción de una droga con su receptor desencadena una secuencia de eventos moleculares que resultan en una respuesta farmacológica o farmacodinámica. El término farmacodinámica se refiere a la relación entre la concentración del medicamento en el sitio de acción (receptor) y la respuesta farmacológica. Existe una estrecha relación entre la farmacodinámica, que estudia los efectos de un fármaco sobre un organismo blanco, y la farmacocinética, la cual describe la acción de un organismo sobre el destino de un fármaco.

El comienzo, la intensidad y la duración del efecto farmacológico dependen tanto de la dosis como de la farmacocinética de la droga. El tiempo que una droga permanece en una concentración por encima de la concentración mínima efectiva, también denominado duración de la acción (t_{eff}), ha demostrado ser de gran importancia en la optimización de la respuesta terapéutica de muchos fármacos. Por ejemplo, el t_{eff} de drogas que siguen un modelo farmacocinético de un compartimiento luego de su inyección endovenosa aumenta en forma proporcional con su tiempo de vida media ($t_{1/2}$). Contrariamente, un incremento de la dosis no resulta en un aumento directamente proporcional del t_{eff} (Shargel y col., 2005c).

Numerosas evidencias han indicado que los ensayos *in vitro* para citoquinas y hormonas generalmente son de utilidad para evaluar las interacciones con su receptor pero no predicen la actividad *in vivo* de las mismas. Para analizar si la mejora de las propiedades farmacocinéticas del rhIFN- α 2b4N se traduce en una acción farmacológica más potente *in vivo*, se evaluó la actividad antitumoral de dicha variante en ratones *nude*.

En un experimento, se estudió el efecto de una única dosis semanal de $3 \cdot 10^5$ UI de rhIFN- α 2b4N sobre la velocidad de crecimiento de tumores sólidos de células PC-3 (origen prostático) implantados subcutáneamente en los animales inmunocomprometidos. El mismo esquema terapéutico se aplicó a un segundo grupo de animales con rhIFN- α 2b no glicosilado y de un tercer lote de animales con rhIFN- α 2b-PEG12kDa. Experiencias realizadas previamente en el laboratorio indicaron que no existen diferencias significativas en el crecimiento de tumores tratados con este régimen de rhIFN- α 2b no glicosilado con respecto a un grupo de animales control (sin tratamiento).

Como se observa en la Fig. 57, el tratamiento con rhIFN- α 2b4N produjo una disminución de la velocidad de crecimiento del tumor en comparación con los animales tratados con la citoquina no glicosilada. De esta manera, el volumen del tumor de los ratones bajo terapia con la citoquina hiperglicosilada se mantuvo por debajo de los valores obtenidos para los ratones tratados con rhIFN- α 2b no modificado durante todo el tratamiento, acrecentándose las diferencias hacia el final del mismo. Así, luego de 33 días de tratamiento, los tumores del grupo tratado con rhIFN- α 2b4N exhibieron un volumen promedio del 40% con respecto al grupo tratado con rhIFN- α 2b no glicosilado ($0,95 \pm 0,46 \text{ cm}^3$ versus $2,48 \pm 1,07 \text{ cm}^3$, respectivamente, $p=4,40 \cdot 10^{-3}$).

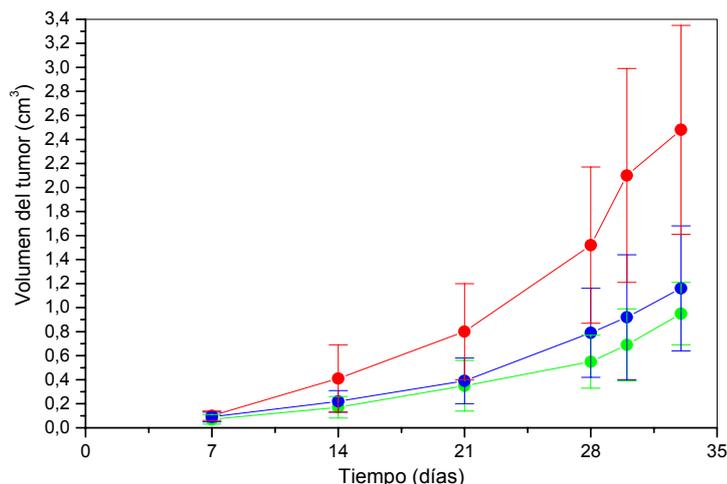


Fig. 57. Evaluación del efecto de diferentes variantes del rhIFN-α2b sobre el crecimiento de tumores de células PC-3 implantadas subcutáneamente en ratones *nude*.

Tres grupos de siete ratones *nude* fueron inyectados por vía subcutánea con 2.10^6 células de la línea tumoral prostática PC-3. Dos días después de la implantación, se comenzó el tratamiento consistente en una inyección semanal de 3.10^5 UI del rhIFN-α2b no glicosilado (●), rhIFN-α2b4N (●) y rhIFN-α2b-PEG12kDa (●). En el gráfico se representó, en el eje de ordenadas, el volumen del tumor (determinado por medición de las dimensiones del tumor con un calibre, asumiendo una geometría elipsoidal) en función del tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento, en el eje de abscisas. Los resultados se expresan como el valor promedio \pm SD ($n=7$).

Con el fin de calcular la velocidad de crecimiento tumoral, la evolución del tumor en el tiempo se dividió en dos fases semejantes para los tres grupos de tratamiento (Tabla XXXI). Para todas las moléculas utilizadas como agentes terapéuticos, el desarrollo tumoral fue más lento en la primera fase, que incluyó desde el día 7 hasta el día 28 desde el inicio de la terapia, mientras que durante la segunda fase, que abarcó desde el día 28 hasta el final del tratamiento, el crecimiento del tumor se produjo más rápidamente. No obstante, en ambas etapas la velocidad de crecimiento tumoral en los animales tratados con rhIFN-α2b no glicosilado fue significativamente mayor a la correspondiente a los animales tratados con la citoquina hiperglicosilada (3,5 veces superior en la primera etapa, $p=1,05.10^{-3}$, y 2,4 veces mayor en la segunda etapa, $p=0,02$). Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en las velocidades de crecimiento tumoral de los grupos tratados con la variante glicosilada rhIFN-α2b4N y con la variante pegilada rhIFN-α2b-PEG12kDa en ninguna de las etapas.

Luego de 33 días de tratamiento, los animales fueron sacrificados y los tumores fueron extraídos para la determinación de su peso (Fig. 58). Los resultados resumidos en la Tabla XXXI indican que una única dosis semanal de 3.10^5 UI de rhIFN-α2b4N por animal reduce significativamente el peso del tumor en comparación con el mismo régimen de rhIFN-α2b no glicosilado. En concordancia con los resultados anteriores, los tumores tratados con la citoquina hiperglicosilada demostraron un 40% del peso correspondiente al grupo control tratados con la citoquina no modificada ($0,68 \pm 0,40$ g versus $1,67 \pm 0,85$ g, respectivamente, $p=1,60.10^{-3}$). Contrariamente, las diferencias observadas entre la terapia con las variantes rhIFN-α2b4N y rhIFN-α2b-PEG12kDa no resultaron estadísticamente significativas ($p=0,62$), si bien el volumen tumoral promedio del grupo tratado con la variante hiperglicosilada fue 20% menor que el del grupo tratado con la variante pegilada.

Tabla XXXI. Terapia de tumores sólidos de la línea celular humana prostática PC-3 implantados en ratones *nude* con 3.10^5 UI semanales de diferentes derivados del rhIFN- $\alpha 2b$.

Variante de rhIFN- $\alpha 2b$	Velocidad de crecimiento del tumor ($\text{cm}^3 \cdot \text{día}^{-1}$)		Peso del tumor al finalizar el tratamiento (g)
	Primera fase (día 7 a 28)	Segunda fase (día 28 a 33)	
rhIFN- $\alpha 2b$ no glicosilado	$0,07 \pm 0,03$	$0,19 \pm 0,09$	$1,67 \pm 0,85$
rhIFN- $\alpha 2b 4N$	$0,02 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,05$	$0,68 \pm 0,40$
rhIFN- $\alpha 2b$ PEG12kDa	$0,03 \pm 0,02$	$0,08 \pm 0,06$	$0,83 \pm 0,79$

Los parámetros fueron calculados para cada animal y se expresan como el valor promedio \pm SD (n=7).

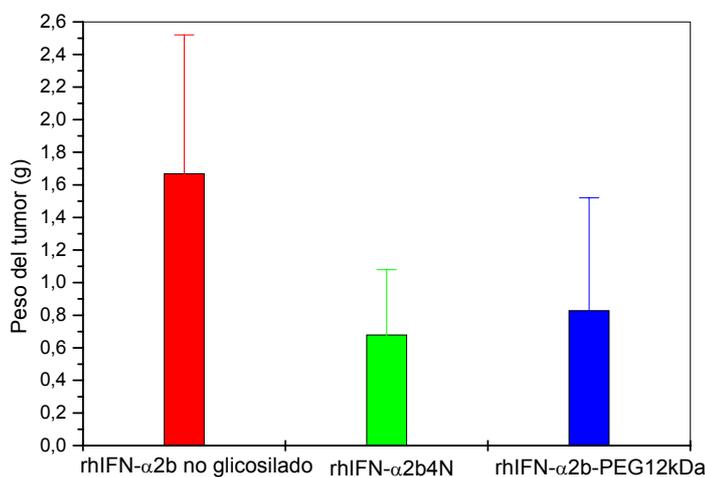


Fig. 58. Determinación del peso del tumor generado por inoculación de células prostáticas humanas de la línea PC-3 en ratones *nude* luego de la terapia con diferentes variantes del rhIFN- $\alpha 2b$.

Luego de 33 días de tratamiento con una única inyección semanal de 3.10^5 UI por ratón de rhIFN- $\alpha 2b$ no glicosilado (■), rhIFN- $\alpha 2b 4N$ (■) y rhIFN- $\alpha 2b$ -PEG12kDa (■), los ratones fueron sacrificados y los tumores fueron extraídos y pesados. Los resultados se expresan como el valor promedio \pm SD (n=7).

En la Fig. 59 se observa una fotografía de los tumores extraídos a partir de cada grupo de animales, donde se advierte a simple vista la diferencia entre los tamaños alcanzados luego de 33 días de tratamiento con los diferentes derivados del rhIFN- $\alpha 2b$. Además, en forma macroscópica, se puede observar que la disminución del crecimiento tumoral fue acompañada por una reducción de la vascularización del carcinoma en los ratones que recibieron la terapia con el rhIFN- $\alpha 2b 4N$.

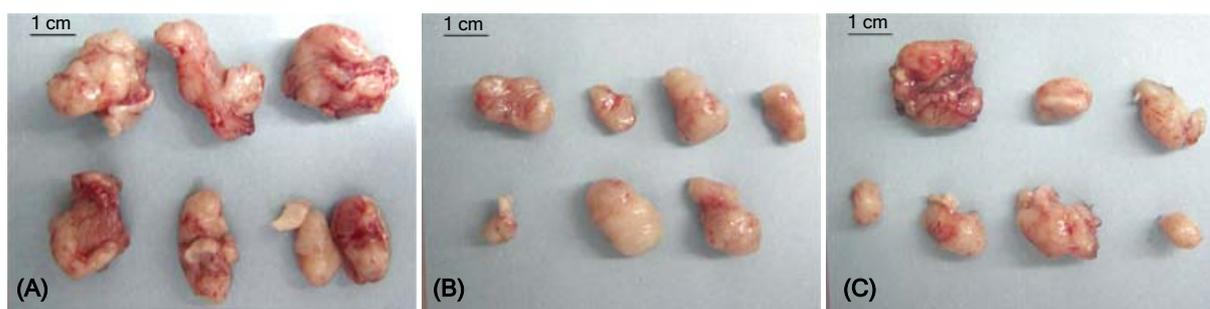


Fig. 59. Fotografías de los tumores de células PC-3 extraídos a partir de ratones *nude* tratados con diferentes variantes del rhIFN- α 2b.

Los tumores extraídos de ratones *nude* tratados con 3.10^5 UI por ratón de rhIFN- α 2b no glicosilado (A), rhIFN- α 2b4N (B) y rhIFN- α 2b-PEG12kDa (C) fueron pesados y fotografiados. Se observa macroscópicamente el menor tamaño y la menor vascularización de los tumores que recibieron la terapia con la citoquina hiperglicosilada en comparación con la molécula no glicosilada.

Los efectos antitumorales del IFN- α no sólo se atribuyen a su capacidad de inhibir la proliferación de células tumorales de diferentes orígenes histológicos, sino también a sus efectos antiangiogénicos. El crecimiento progresivo y la metástasis de tumores malignos depende de una neovascularización adecuada, cuyo alcance se encuentra determinado por el balance entre las moléculas proangiogénicas y antiangiogénicas liberadas por las células cancerígenas y las células adyacentes del huésped (Folkman y Shing, 1992). Se ha demostrado que el IFN- α disminuye la expresión de moléculas proangiogénicas como el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF, *basic fibroblast growth factor*), la metaloproteinasa de matriz-9 (MMP-9, *matrix metalloproteinase-9*), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) e IL-8, reduciendo así la formación de vasos sanguíneos y contribuyendo a la inhibición del desarrollo tumoral. Slaton y col. (1999) confirmaron estos resultados demostrando que una dosis diaria de 10.000 UI de IFN- α disminuye el crecimiento de tumores derivados de células de vejiga resistentes a su acción antiproliferativa mediante una reducción de la vascularización, evidenciada por recuento de vasos sanguíneos luego de coloración inmunohistoquímica con anticuerpos anti-CD31. Otros autores reportaron que un régimen combinado de IFN- α y gemcitabina resulta en la inhibición del crecimiento de un carcinoma pancreático implantado ortotópicamente en ratones *nude*, la cual es mediada tanto por la acción antiproliferativa del fármaco citotóxico como por la actividad antiangiogénica del IFN- α (Solorzano y col., 2003). En ambos casos se observó la disminución de la expresión de moléculas proangiogénicas utilizando técnicas inmunohistoquímicas.

Los resultados obtenidos indican que, efectivamente, el incremento de la vida media en plasma del rhIFN- α 2b4N con respecto a su análogo no glicosilado se manifiesta en una mayor actividad biológica antitumoral *in vivo*. Además, en contraste con la importante disminución de la actividad biológica *in vitro*, la adición de oligosacáridos al rhIFN- α 2b para obtener la molécula hiperglicosilada rhIFN- α 2b4N se tradujo en un incremento significativo de su eficacia terapéutica *in vivo*. Si bien la terapia aplicada no produjo la inhibición de la proliferación de los tumores de origen prostático, la citoquina glicosilada retardó considerablemente el crecimiento tumoral en comparación con la proteína no modificada, sin mostrar diferencias significativas con la eficacia del rhIFN- α 2b-PEG12kDa. Un gran número de ensayos clínicos han concluido que aunque los

IFNs no modificados pueden ser efectivos contra muchos neoplasmas hematopoyéticos, son inefectivos contra la mayoría de los tumores sólidos (Gutterman, 1994; Einhorn y Grandner, 1996). Dichos estudios concluyeron que la carencia de niveles terapéuticos sostenidos a causa de la corta vida media del rhIFN- α 2b en la circulación de los pacientes es responsable de su fracaso para inhibir o erradicar tumores primarios o prevenir la metástasis. Esto explicaría que los tumores sólidos de células PC-3 sean sensibles a la acción de la citoquina rhIFN- α 2b4N, la cual presenta un menor *clearance* plasmático, permitiendo mantener una concentración superior a la concentración mínima efectiva durante un mayor período de tiempo.

Muchos estudios clínicos intentaron prolongar la duración del efecto terapéutico mediante el diseño de una gran variedad de esquemas de tratamiento con rhIFN- α 2b no glicosilado. Teniendo en cuenta que el tiempo de residencia de dicha molécula en plasma es de escasas horas, cabe suponer que una mayor exposición del tumor a su acción requerirá una administración más frecuente.

Por este motivo, en otra serie de experimentos, se evaluó la eficacia terapéutica de otro régimen de tratamiento con rhIFN- α 2b empleando el mismo modelo de tumor de células PC-3 implantado en ratones *nude*. Un grupo de animales (n=6) recibió una dosis semanal de rhIFN- α 2b no glicosilado dividida en tres inyecciones por semana, con el fin de alcanzar niveles sostenidos de la citoquina en plasma. Por otra parte, otro grupo de animales (n=6) fue tratado con la misma dosis semanal de rhIFN- α 2b4N en una única inyección por semana. En base a datos encontrados en bibliografía, que determinaron como dosis óptima de rhIFN- α 2b-PEG12kDa para el tratamiento de tumores de células PC-3 una inyección semanal de $7 \cdot 10^4$ UI (Huang y col., 2002) o de $1,1 \cdot 10^5$ UI de la citoquina (Demers y col., 2002), se utilizó una dosis de $1 \cdot 10^5$ UI de cada variante por ratón por semana.

El tratamiento con una única inyección semanal de $1 \cdot 10^5$ UI de la citoquina hiperglicosilada, dosis inferior a la utilizada en el experimento anterior, también causó una reducción del desarrollo tumoral en comparación con el grupo de animales que recibieron la terapia con la proteína no glicosilada, alcanzándose un volumen 50% menor al término del tratamiento ($1,43 \pm 0,67 \text{ cm}^3$ versus $2,49 \pm 1,47 \text{ cm}^3$, respectivamente, $p=0,04$) (Fig. 60A). Este resultado indicaría que la distribución de la dosis semanal en tres inyecciones de $3,3 \cdot 10^4$ UI de rhIFN- α 2b no glicosilado para lograr una mayor exposición de las células tumorales fue ineficaz en comparación con la misma dosis total inoculada una vez por semana de la variante glicosilada.

De la misma manera que en el experimento descrito anteriormente, la velocidad de crecimiento de los tumores tratados con ambas variantes del rhIFN- α 2b se incrementó entre el día 21 y 28 desde el comienzo de la terapia. En la primera fase, la velocidad de crecimiento de los tumores tratados con la citoquina no glicosilada fue superior a la correspondiente a los tratados con la variante rhIFN- α 2b4N ($p=0,02$), mientras que en la segunda fase la diferencia encontrada no fue estadísticamente significativa para el nivel de confianza requerido ($p=0,08$) (Tabla XXXII).

La determinación del peso de los tumores extraídos a partir de los animales de cada grupo en el día 33 desde el inicio de la terapia concordó con las mediciones del volumen tumoral. Se observó una disminución de aproximadamente 50% del peso del tumor del grupo tratado con rhIFN- α 2b4N con respecto al grupo tratado con su contraparte no glicosilada ($p=0,04$) (Fig. 60B, Tabla XXXII).

Los resultados hallados sugieren que la terapia con una dosis tres veces menor de rhIFN- α 2b4N ($1 \cdot 10^5$ UI en comparación con $3 \cdot 10^5$ UI por ratón por semana) tiene una incidencia

significativa sobre el crecimiento de tumores de células PC-3 implantados subcutáneamente en ratones *nude*, con efectos antitumorales similares a los observados con una dosis superior. Sin embargo, si se compara la velocidad de crecimiento tumoral bajo el tratamiento con ambas dosis de rhIFN- α 2b4N, se deduce que existen diferencias significativas en la primera etapa, donde una menor dosis se refleja en una mayor velocidad de desarrollo tumoral ($p=0,03$).

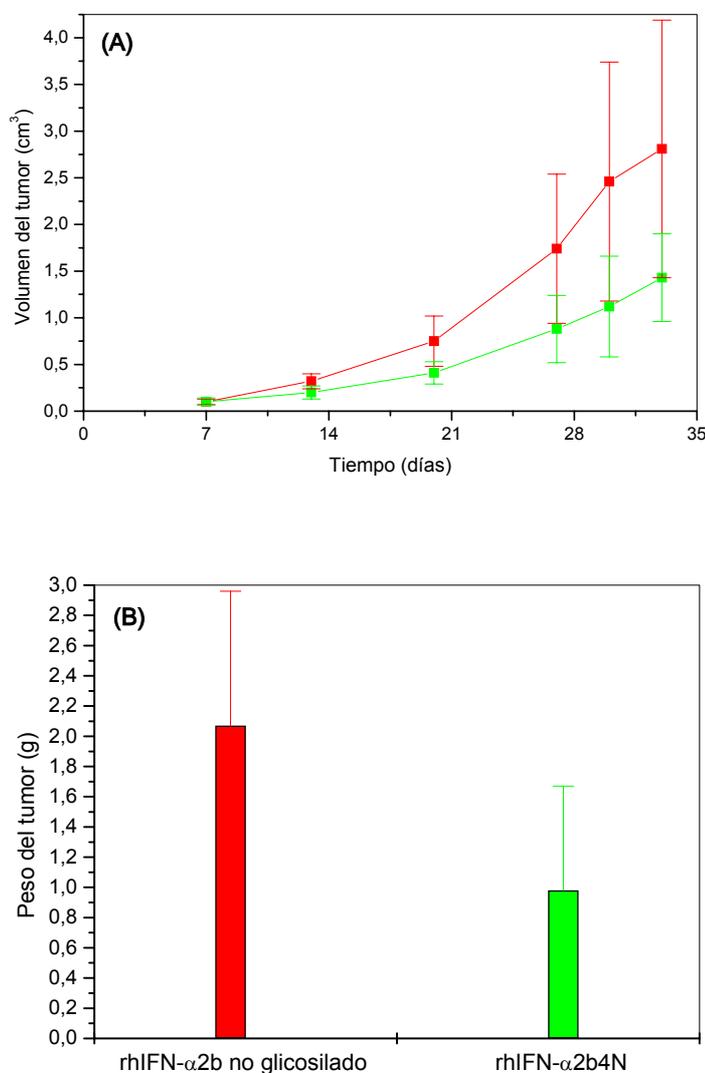


Fig. 60. Actividad biológica *in vivo* de diferentes variantes del rhIFN- α 2b en ratones *nude* inculados por vía subcutánea con células tumorales de origen prostático de la línea PC-3.

Dos grupos de seis ratones *nude* fueron inyectados por vía subcutánea con $2 \cdot 10^6$ células de la línea PC-3. Dos días después de la implantación, se comenzó el tratamiento consistente en una dosis semanal de $1 \cdot 10^5$ UI de rhIFN- α 2b no glicosilado (\bullet), dividida en tres inyecciones de $3,3 \cdot 10^4$ UI, y de $1 \cdot 10^5$ UI de rhIFN- α 2b4N (\bullet), administrada mediante una única inyección semanal. (A) Evolución del volumen tumoral en función del tiempo transcurrido desde el inicio del tratamiento. (B) Peso promedio de los tumores extraídos al final de la terapia. Los resultados se expresan como el valor promedio \pm SD ($n=6$).

Tabla XXXII. Terapia de tumores sólidos de la línea celular humana prostática PC-3 implantados en ratones *nude* con 1.10^5 UI semanales de diferentes derivados del rhIFN- α 2b.

Variante de rhIFN- α 2b	Velocidad de crecimiento del tumor ($\text{cm}^3 \cdot \text{día}^{-1}$)		Peso del tumor al finalizar el tratamiento (g)
	Primera fase (día 7 a 28)	Segunda fase (día 28 a 33)	
rhIFN- α 2b no glicosilado	0,08 \pm 0,04	0,18 \pm 0,10	2,07 \pm 0,89
rhIFN- α 2b4N	0,04 \pm 0,02	0,09 \pm 0,06	0,98 \pm 0,69

Los parámetros fueron calculados para cada animal y se expresan como el valor promedio \pm SD (n=6).

Indudablemente, la optimización de la dosis y el esquema de tratamiento, que no constituyen objetivos del presente trabajo, es un requisito para alcanzar la máxima actividad *in vivo*, que demanda el diseño de numerosas modalidades de tratamiento y el uso de diferentes dosis terapéuticas. El empleo del rhIFN- α o de sus derivados pegilados, solos o en combinación con agentes químicos citotóxicos, se ha experimentado para la terapia de diversas patologías tumorales en animales de experimentación en un amplio rango de dosis. Por ejemplo, la dosis biológica óptima de rhIFN- α 2b-PEG12kDa para el tratamiento de carcinomas de ovario o de próstata implantados ortotópicamente en ratones *nude* fluctuó entre 7.000 UI y 70.000 UI semanales, respectivamente (Tedjarati y col., 2002; Huang y col., 2002). En el caso del rhIFN- α 2b no modificado, la administración diaria de una dosis muy inferior a la máxima dosis tolerada produjo el mayor efecto antiangiogénico en la terapia de cáncer de vejiga en la misma cepa de ratones (Slaton y col., 1999). La disparidad entre la frecuencia de administración de ambas citoquinas es consecuencia directa de las diferencias en sus propiedades farmacocinéticas. Estableciendo un paralelismo con los ejemplos mencionados, nuestros experimentos demostraron que el incremento de la vida media plasmática del rhIFN- α 2b4N es de primordial importancia para su actividad antitumoral *in vivo*. Por lo tanto, el perfil farmacocinético de la citoquina hiperglicosilada permitiría, además de reducir la frecuencia de administración, alcanzar una concentración plasmática relativamente estable y de esta manera resultar terapéuticamente más efectiva que los niveles fluctuantes obtenidos a través de tres inyecciones semanales de la misma dosis total del rhIFN- α 2b no glicosilado.

Puesto que los estudios se realizaron en ratones inmunodeficientes, es posible que la aplicación de la terapia a animales o pacientes inmunológicamente no comprometidos y que padezcan patologías tumorales derive en un efecto terapéutico superior. Se sabe que el IFN- α 2b posee un amplio rango de actividades inmunomoduladoras, entre las que se encuentran su capacidad de aumentar la citotoxicidad de células T, incrementar la expresión de moléculas del MHC de tipo I y promover las respuestas inmunes mediadas por linfocitos Th1 (Brassard y col., 2002), funciones que pueden mejorar el efecto antitumoral de la citoquina. En el modelo animal utilizado, que carece de un timo funcional y, por lo tanto, produce un número escaso de células T maduras, no es posible evaluar estas funciones de la citoquina, las cuales podrían contribuir con otros mecanismos antitumorales.

Los hallazgos encontrados en los experimentos *in vivo* revisten una especial importancia, ya que permiten concluir que la mejora farmacocinética del rhIFN- α 2b mediante la aplicación de glicoingeniería se correlacionó con un incremento de la eficacia terapéutica de la citoquina.

11.3. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL rhIFN- α 2b4N EN PLASMA DE RATA

Muchos péptidos y proteínas terapéuticas son vulnerables al ataque de enzimas proteolíticas presentes en el plasma sanguíneo, demandando la administración de dosis elevadas para lograr el efecto farmacológico deseado. El rhIFN- α 2b puede ser administrado por vía subcutánea, endovenosa o intramuscular, resultando en diferentes perfiles farmacocinéticos. Cualquiera fuere la vía de inoculación, la citoquina es rápidamente inactivada por los fluidos y tejidos corporales, y eliminada del plasma a las pocas horas desde su administración. Como se mencionó anteriormente, uno de los mecanismos de eliminación del rhIFN- α 2b es la proteólisis e inactivación por proteasas séricas (Shetcher y col., 2001; Peleg-Shulman y col., 2004). La presencia de glúcidos en la muteína rhIFN- α 2b4N podría conferir resistencia al ataque proteolítico, constituyendo una de las causas por las cuales dicha molécula presenta una mayor vida media plasmática en animales de experimentación con respecto a su homóloga no glicosilada.

La estabilidad de la citoquina hiperglicosilada en plasma de rata a 37°C fue analizada en comparación con el rhIFN- α 2b no glicosilado y con la variante pegilada rhIFN- α 2b-PEG12kDa. Una masa equivalente de los tres derivados de la citoquina se diluyó en plasma de rata y se incubó durante períodos de tiempo variables a 37°C. Se prepararon tres tubos independientes para cada molécula, de manera de obtener los resultados por triplicado. El porcentaje de actividad biológica antiviral remanente con respecto a la actividad biológica inicial se graficó en función del tiempo transcurrido desde el comienzo de la incubación, el cual se extendió hasta 96 h (Fig. 61).

Bajo las condiciones ensayadas, que intentaron imitar un ambiente similar al fisiológico, la actividad antiviral del rhIFN- α 2b no glicosilado disminuyó a lo largo del tiempo con un tiempo de vida media ($t_{1/2,50\%}$, definido como el tiempo necesario para alcanzar un 50% de la actividad biológica inicial) de $39,1 \pm 0,6$ h. La potencia biológica de la variante rhIFN- α 2b4N, en cambio, disminuyó más lentamente, conservando alrededor de un 60% de la actividad inicial luego de 96 h transcurridas desde el comienzo de la incubación. Por consiguiente, la velocidad de inactivación en plasma de la proteína no modificada, determinada como la pendiente de la fase lineal de la curva de actividad remanente en función del tiempo, fue mayor que la correspondiente a la citoquina hiperglicosilada ($2,12 \pm 0,08\% \cdot h^{-1}$ en comparación con $0,37 \pm 0,07\% \cdot h^{-1}$, $p=9,30 \cdot 10^{-6}$, ambas calculadas en el intervalo de tiempo comprendido entre 24 y 72 h). Este experimento pone de manifiesto la mayor estabilidad de la variante rhIFN- α 2b4N en plasma, el cual proviene del mismo modelo animal utilizado para evaluar la cinética *in vivo*, con respecto al rhIFN- α 2b producido en bacterias. El resultado obtenido sugiere que la glicosilación conferiría una mayor resistencia a la inactivación por proteasas plasmáticas a una temperatura fisiológica, probablemente debido al encubrimiento de los sitios de clivaje e impedimento estérico para que se desarrolle la actividad enzimática. Esta característica influiría positivamente sobre la farmacocinética *in vivo* de la molécula hiperglicosilada, sumándose a los demás efectos que contribuyen al retraso de la eliminación plasmática de la citoquina mediados por la presencia de carbohidratos.

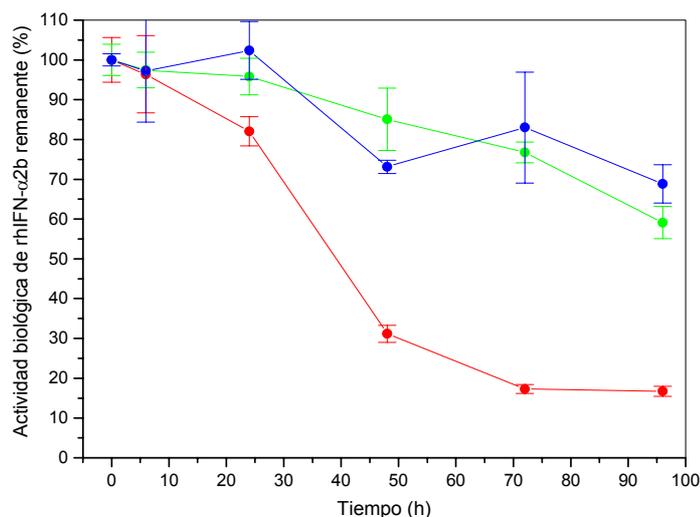


Fig. 61. Estabilidad de derivados del rhIFN-α2b en plasma de rata.

Una masa equivalente (15 ng) del rhIFN-α2b no glicosilado (●), rhIFN-α2b4N (●) y rhIFN-α2b-PEG12kDa (●) fue diluida en 300 μl de plasma de rata e incubada a 37°C. Se tomaron alícuotas a los tiempos indicados y se determinó la actividad biológica antiviral. Se graficó el porcentaje de actividad biológica remanente, en el eje de ordenadas, en función del tiempo transcurrido desde el inicio de la incubación, en el eje de abscisas. Los resultados se expresan como el valor promedio ± SD (n=3).

El incremento de la estabilidad del rhIFN-α2b en plasma también se logró mediante conjugación con una molécula de PEG de 12 kDa. En efecto, el rhIFN-α2b-PEG12kDa preservó aproximadamente un 65% de su actividad inicial luego de 96 h de incubación, con una velocidad de inactivación muy similar a la del rhIFN-α2b4N ($0,35 \pm 0,08\% \cdot h^{-1}$ versus $0,37 \pm 0,07\% \cdot h^{-1}$, respectivamente, $p=0,81$). Diversas tecnologías han sido aplicadas con el fin de mejorar la resistencia del rhIFN-α2b a la proteólisis. Por ejemplo, Shetcher y col. (2001) obtuvieron un derivado de la citoquina resistente a la inactivación por proteasas presentes en suero humano mediante la unión covalente de siete moléculas de 2-sulfo-9-fluorenilmetoxicarbonilo (FMS) a los grupos amino del rhIFN-α2. La especie resultante, FMS₇-IFN-α2, también demostró mayor resistencia a la digestión con otras proteasas, como la α-quimotripsina humana. La conjugación con ácidos polisiálicos, polímeros de ácido *N*-acetilneuramínico que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, también se ha utilizado con el fin de incrementar la estabilidad de proteínas frente a la digestión proteolítica, aplicándose exitosamente a enzimas como la asparaginasa o la catalasa (Gregoriadis y col., 2005). Todas las tecnologías mencionadas actuarían de una manera similar; es decir, restringiendo el acceso de las enzimas proteolíticas a sitios de la proteína susceptibles de proteólisis.

La actividad biológica del rhIFN-α2b no glicosilado, rhIFN-α2b4N y rhIFN-α2b-PEG12kDa en BSA 0,1% (P/V) en PBS a 37°C se mantuvo constante e igual a la actividad inicial durante las 96 h de incubación (resultados no mostrados). Este resultado indica que, al menos durante el período de tiempo evaluado, la temperatura de incubación no posee un efecto importante sobre la estabilidad de las variantes del rhIFN-α2b, confirmando que la inactivación de las citoquinas es causada por la presencia de componentes plasmáticos.

11.4. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL rhIFN- α 2b4N FRENTE A LA ACCIÓN DE PROTEASAS ESPECÍFICAS

Como se describió anteriormente, el rhIFN- α 2b4N presenta mayor resistencia a la acción de proteasas séricas en comparación con la citoquina aglicosilada, lo cual fue demostrado por su mayor estabilidad en plasma.

Con el fin de estudiar la susceptibilidad de esta molécula frente a proteasas específicas, se incubaron diferentes variantes de la citoquina con las proteasas tripsina y elastasa.

11.4.1. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD FRENTE A TRIPSINA

La tripsina es una enzima proteolítica producida por el páncreas y secretada en el duodeno, sitio donde su actividad es esencial para completar la digestión. En personas sanas, su concentración plasmática oscila en un rango comprendido entre 10 y 57 ng.mL⁻¹, incrementándose sus niveles en enfermedades pancreáticas. La tripsina es una endoproteinasa miembro de la familia de las serina proteasas y posee alta especificidad por los enlaces peptídicos del extremo carboxiterminal de los aminoácidos Arg o Lys (Neurath, 1990). Estas características la convierten en un modelo atractivo para el estudio de diversas proteasas plasmáticas con sitios de clivaje similares, entre ellas la plasmina y la trombina.

La estabilidad del rhIFN- α 2b4N frente a la degradación por la enzima tripsina fue estudiada en comparación con el rhIFN- α 2b no glicosilado y el rhIFN- α 2bPEG12kDa. Una masa equivalente de los tres derivados de la citoquina fue tratada con la enzima a 37°C durante diferentes períodos de tiempo. La actividad antiviral residual en las muestras se graficó en función del tiempo transcurrido desde el comienzo de la incubación, el cual se extendió hasta 24 h (Fig. 62).

El comportamiento del rhIFN- α 2b no glicosilado y el rhIFN- α 2b4N frente a la acción proteolítica de la tripsina fue similar, observándose una rápida inactivación de ambas citoquinas en el transcurso de las primeras horas de tratamiento. Luego de 4 h de incubación, la actividad biológica de las citoquinas se redujo a un 15% de la actividad inicial, con una velocidad de inactivación comparable (22,4%.h⁻¹ para la molécula no glicosilada y 20,7%.h⁻¹ para la variante hiperglicosilada). El proceso de degradación continuó a lo largo del tratamiento, alcanzando una actividad residual entre 0,2 y 0,5% luego de 24 h. Contrariamente a lo esperado, este resultado indica que los oligosacáridos del rhIFN- α 2b4N no protegen a la citoquina frente a la acción proteolítica de la tripsina. Es probable que, debido a la gran cantidad de residuos susceptibles a la degradación por tripsina (Arg y Lys) que posee el rhIFN- α 2b, las cadenas de oligosacáridos no logren enmascarar determinados sitios de clivaje pertenecientes a zonas de la molécula claves para su bioactividad.

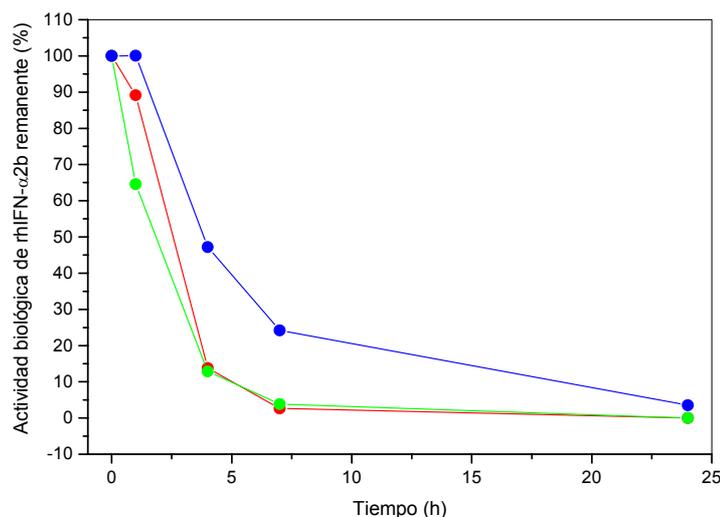


Fig. 62. Estabilidad de derivados del rhIFN-α2b frente a la acción de la enzima tripsina.

Una masa equivalente (750 ng) del rhIFN-α2b no glicosilado (●), rhIFN-α2b4N (●) y rhIFN-α2b-PEG12kDa (●) fue tratada con 75 ng de enzima tripsina a 37°C durante tiempos variables. Se determinó la actividad biológica antiviral en cada una de las muestras y se graficó el porcentaje de actividad biológica remanente, en el eje de ordenadas, en función del tiempo transcurrido desde el inicio de la incubación, en el eje de abscisas.

La inactivación del rhIFN-α2bPEG12kDa por la acción proteolítica de la tripsina se produjo de manera más lenta. Luego de 4 h de incubación, la citoquina conservó aproximadamente un 50% de su actividad biológica inicial, exhibiendo una velocidad de inactivación menor al de las moléculas no pegiladas ($11,9\% \cdot h^{-1}$). No obstante, el tratamiento prolongado del rhIFN-α2bPEG12kDa con la enzima resultó en una actividad residual de aproximadamente 3% luego de 24 h de incubación. La mayor resistencia del rhIFN-α2bPEG12kDa frente a la degradación por tripsina puede explicarse teniendo en cuenta los sitios de la citoquina que participan en la unión con el polímero PEG. Como se mencionó en el apartado Introducción, el sitio de adición de PEG a un polipéptido depende del sistema de activación de la molécula del polímero. En el caso del PEG-Intron® la síntesis se realiza mediante la reacción del rhIFN-α2b purificado con un derivado electrofílico de PEG, el succinimidil carbonato-PEG, en solución de fosfatos a pH 6,5. En principio, la pegilación puede ocurrir en cualquiera de los numerosos sitios nucleofílicos de la citoquina, incluyendo los grupos ε-amino de 10 Lys, el grupo α-amino de la Cys N-terminal, los átomos de N de los anillos imidazólicos de 3 His y los grupos hidroxilos de 14 Ser, 10 Thr y 5 Tyr. Varios factores determinan la reactividad relativa de los sitios potenciales de pegilación, entre ellos la nucleofilicidad intrínseca, la accesibilidad al solvente, la conformación proteica y los efectos electrónicos locales. Se encuentra descrito que el producto final PEG-Intron® consiste en una población heterogénea de especies monopegiladas en diferentes sitios de la proteína. Wang y col. (2002) demostraron que el principal isómero posicional es aquel en el cual la molécula de PEG se encuentra unida al residuo His34. No obstante, el resto de los isómeros posicionales se encuentran pegilados en diversos residuos de Lys (31,49, 83, 112, 121, 131, 133, 134, 164), así como también en Ser163, Cys1 y en otro residuo de His (His7). La unión covalente del polímero a diferentes residuos de Lys, sitios potenciales de clivaje de la tripsina, restringiría el acceso de la enzima, siendo la

causa de la menor velocidad de inactivación del rhIFN- α 2bPEG12kDa, en comparación con la molécula no modificada.

11.4.1. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD FRENTE A ELASTASA

La elastasa leucocitaria es una proteasa localizada en los lisosomas de los leucocitos polimorfonucleares que se libera en respuesta a reacciones inflamatorias, siendo capaz, entre otras cosas, de degradar proteínas de la matriz extracelular, entre ellas el componente C3 del complemento, el TNF- α y la IL-6. La elastasa pertenece a la familia de las serina proteasas y posee especificidad hacia sustratos que contienen residuos de Ala y Val (Neurath, 1990; Renaud y col., 1983).

Con el fin de evaluar la resistencia del rhIFN- α 2b no glicosilado, rhIFN- α 2b4N y rhIFN- α 2bPEG12kDa frente a la digestión con la enzima elastasa, una masa equivalente de las tres variantes (20 ng) se incubó con 100 mU de proteasa a 37°C durante diferentes períodos de tiempo. La actividad antiviral residual en las muestras se graficó en función del tiempo transcurrido desde el comienzo de la incubación, el cual se extendió hasta 7 h (Fig. 63).

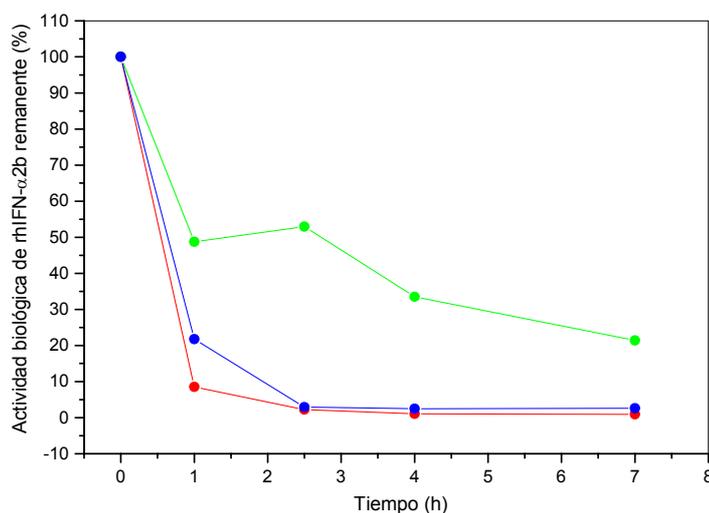


Fig. 63. Estabilidad de derivados del rhIFN- α 2b frente a la acción de la enzima elastasa.

Una masa equivalente (20 ng) del rhIFN- α 2b no glicosilado (●), rhIFN- α 2b4N (●) y rhIFN- α 2b-PEG12kDa (●) fue tratada con 100 mU de enzima elastasa a 37°C durante tiempos variables. Se determinó la actividad biológica antiviral en cada una de las muestras y se graficó el porcentaje de actividad biológica remanente, en el eje de ordenadas, en función del tiempo transcurrido desde el inicio de la incubación, en el eje de abscisas.

Como se observa en la Fig. 63, mientras que el rhIFN- α 2b no glicosilado y el rhIFN- α 2bPEG12kDa fueron rápidamente inactivados por el tratamiento con elastasa, el rhIFN- α 2b4N mostró una moderada resistencia al ataque proteolítico. Se observaron mínimas diferencias entre el comportamiento de la citoquina no glicosilada y la molécula pegilada; mientras que la actividad biológica de la primera se redujo a menos de un 10% de la actividad inicial luego de 1 h de tratamiento, la segunda preservó alrededor de un 20% de actividad residual al final del mismo período. Contrariamente, el rhIFN- α 2b4N conservó más de un 50% de

actividad antiviral luego 2,5 h de incubación. En el caso del rhIFN- α 2b no glicosilado y el rhIFN- α 2bPEG12kDa, la digestión proteolítica prolongada (7 h) provocó una pérdida completa de actividad, a diferencia de lo obtenido con el rhIFN- α 2b4N, cuya actividad remanente fue superior al 20%.

En concordancia con lo que se halla descrito en bibliografía, el comportamiento de la variante rhIFN- α 2b4N frente a la acción de la elastasa demuestra que la glicosilación puede incrementar la estabilidad de glicoproteínas mediante un aumento de su resistencia a la acción de proteasas. Existen diversos ejemplos de citoquinas que exhiben diferencias en su susceptibilidad a la inactivación proteolítica de acuerdo con su grado de glicosilación.

Sareneva y col. (1995) demostraron que los oligosacáridos unidos a la Asn25 del IFN- γ son críticos para conservar su actividad frente al tratamiento con elastasa, plasmina y catepsina G. No ocurre lo mismo con los carbohidratos unidos a la Asn97, los cuales pueden ser completamente removidos sin afectar la estabilidad de la citoquina frente a la proteólisis con las mencionadas enzimas.

Otro ejemplo lo constituye el G-CSF, el cual demuestra una susceptibilidad diferencial a la degradación por elastasa derivada de neutrófilos según se encuentre *O*-glicosilado o no. *In vitro*, la elastasa digiere y, en consecuencia, antagoniza completamente la actividad biológica de la citoquina producida en bacterias. Sin embargo, su análoga *O*-glicosilada es relativamente resistente a la acción de dicha enzima, hecho que ha sido atribuido a la presencia de carbohidratos, ya que la misma molécula deglicosilada enzimáticamente exhibe un comportamiento similar al de la variante bacteriana (Carter y col., 2004).

No obstante, este comportamiento no puede generalizarse para todas las proteínas de importancia biológica. En el caso de la IL-6, la glicosilación de la citoquina no tiene impacto sobre la velocidad de degradación de la molécula por proteasas celulares como la elastasa (Laouar y col., 1993). La deglicosilación de la acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas (PAF-AH) tampoco afecta su susceptibilidad a la proteólisis con tripsina o proteinasa K (Tselepis y col., 2001). Estos ejemplos demuestran la controversia que existe acerca del rol protector de la glicosilación a la acción de proteasas. En nuestro caso, hemos obtenido una variante de rhIFN- α 2b (rhIFN- α 2b4N) que posee una susceptibilidad a la acción de la tripsina equivalente a la correspondiente a citoquina no glicosilada, pero manifiesta un incremento en su resistencia a la degradación por elastasa.

Se ha sugerido que determinadas serina proteasas derivadas de neutrófilos, entre ellas la elastasa leucocitaria, la catepsina G y la proteinasa 3, podrían poseer un importante rol en procesos proteolíticos extracelulares en sitios de inflamación, entre los que se destaca el control de bioactividad de citoquinas. Los mecanismos de control podrían ser de regulación negativa, mediante la degradación de citoquinas inflamatorias, o de regulación positiva, a través de la activación de moléculas a partir de precursores inactivos (Bank y Ansorge, 2001).

El hecho de que la muteína de rhIFN- α 2b hiperglicosilada sea inactivada más lentamente por la elastasa que la citoquina no glicosilada podría justificar las diferencias observadas entre la estabilidad de ambas moléculas en suero (sección 11.3).

CONCLUSIONES

La exquisita especificidad de las moléculas biológicas hacia su blanco clínico ha estimulado su continuo desarrollo y aplicación como agentes terapéuticos. Sin embargo, las proteínas naturales no son las más apropiadas para ser utilizadas como fármacos debido a que su eficacia se ve comprometida por inconvenientes de diverso índole, entre ellos su baja actividad *in vivo* a causa de su escasa estabilidad y su rápida eliminación del torrente sanguíneo.

El hIFN- α 2 ejemplifica este fenómeno universal, ya que se trata de una citoquina terapéutica de bajo peso molecular que sufre de una corta vida media en circulación. Esta proteína se encuentra aprobada para el tratamiento de una amplia variedad de patologías, incluyendo enfermedades virales (como la hepatitis B y C crónica) y tumorales (diferentes formas de leucemia y ciertos tumores sólidos). Aunque un rápido *clearance* del hIFN- α 2 podría considerarse beneficioso en términos de administrar un efecto transitorio y reversible, se ha demostrado extensamente que una duración más prolongada de la acción de la citoquina incide favorablemente sobre su eficacia clínica (Slaton y col., 1999; Baker, 2001). En efecto, dentro de los factores que han sido considerados como responsables del fracaso de la terapia de numerosos pacientes con la forma recombinante del hIFN- α 2 producida en bacterias se encuentran su reducido tiempo de residencia en plasma, los efectos colaterales tóxicos causados por las altas dosis suministradas y la generación de anticuerpos neutralizantes (Einhorn y Grandér, 1996).

En el presente trabajo de tesis se propuso la aplicación de una estrategia de glicoingeniería, más precisamente la adición de sitios potenciales de *N*-glicosilación a la molécula de rhIFN- α 2b, con el fin de mejorar sus propiedades farmacocinéticas y, eventualmente, otras características de la citoquina que influyan positivamente sobre su eficacia terapéutica. El uso de esta tecnología se fundamenta en las numerosas evidencias documentadas acerca de la importancia de esta modificación post-traducciona sobre diversas características de las glicoproteínas (Varki, 1993).

En primera instancia, fue necesario establecer métodos confiables para la cuantificación y la valoración de la actividad biológica, tanto antiviral como antiproliferativa, del rhIFN- α 2b. El principal obstáculo que se presentó para la cuantificación de la citoquina fue la carencia de un estándar apropiado, impedimento lógico cuando se emprende el desarrollo de una molécula nueva o un derivado de la misma.

Con el fin de contar con diferentes opciones para la determinación de la concentración de los derivados de la citoquina, se plantearon dos esquemas de enzoinmunoensayos: un ensayo de ELISA *sandwich*, utilizando un mAb como anticuerpo de captura de la citoquina y anticuerpos policlonales de conejo para su posterior detección, y un ensayo de ELISA competitivo, utilizando un mAb para realizar la competencia entre la citoquina en fase sólida y en solución. Asimismo, se puso a punto la cuantificación mediante un método fisicoquímico (RP-HPLC).

En ambos esquemas de ELISA, se evaluaron 11 mAbs anti-rhIFN- α 2b no glicosilado obtenidos previamente en el laboratorio. Dichos anticuerpos evidenciaron diferentes grados de interacción con la citoquina, manifestándose en amplias diferencias en la sensibilidad y en el límite de detección de los ensayos, lo que permitió seleccionar cuatro mAbs (CA1A3, CA5E6,

CA9C3 y CB15D7) que, exhibiendo parámetros adecuados, mapearan distintas áreas moleculares de la citoquina. Este requisito fue impuesto debido a la necesidad de contar con ligandos que interaccionen con epitopes de la molécula que no sean posteriormente modificados por la unión de carbohidratos. El ensayo *sandwich* presentó un menor límite de detección (entre 0,03 y 0,71 ng.ml⁻¹) con respecto al ensayo competitivo (entre 5,9 y 209,7 ng.ml⁻¹), seleccionándose para la cuantificación de la citoquina en sobrenadantes de cultivo de células de mamífero, donde las proteínas recombinantes se encuentran generalmente en baja concentración. Por otro lado, no se observó influencia del entorno sobre la cuantificación de la citoquina mediante este esquema de ELISA utilizando distintos medios diluyentes para los mAbs CA1A3 y CA5E6. En cambio, el empleo de medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de SFB o de medios acondicionados por el crecimiento celular afectó la cuantificación de la proteína con los mAbs CB15D7 y CA9C3, lo cual podría ser solucionado unificando el medio de dilución de la muestra y el estándar. Por otra parte, el límite de detección del RP-HPLC fue considerablemente mayor (5 µg.ml⁻¹), requiriéndose, además, un elevado grado de pureza de la muestra.

La expresión de todas las muteínas del rhIFN-α2b con un sitio de *N*-glicosilación en células CHO permitió seleccionar al mAb CA5E6 como reactivo para el desarrollo de ambos esquemas inmunoquímicos, ya que, a diferencia de los otros anticuerpos, el mismo fue capaz de reconocer a todas las variantes presentes en los sobrenadantes de cultivo. No obstante, dicho ensayo demostró una subvaloración de la concentración de las proteínas con mayor grado de glicosilación, lo que se atribuyó al requisito del doble reconocimiento del Ag y a problemas estéricos. El ensayo competitivo, donde participa un único epitope de la molécula con la exigencia de ser reconocido por el mAb, aunque permitió determinar concentraciones más cercanas a las reales, exhibió inconvenientes similares al ensayo *sandwich* para cuantificar las variantes hiperglicosiladas de la citoquina. Finalmente, la cuantificación de los derivados hiperglicosilados del rhIFN-α2b, purificados por inmunoafinidad, confirmó al RP-HPLC como la técnica más confiable para la determinación de la concentración de todas las variantes de la citoquina. Dichos resultados fueron corroborados mediante cuantificación espectrofotométrica a λ=280 nm de la variante rhIFN-α2b4N, avalando la utilidad de esta metodología para la cuantificación de una proteína cuando no se cuenta con un estándar idéntico a la misma.

El ensayo de valoración biológica antiviral del rhIFN-α2b consistió en la cuantificación del efecto protector de la citoquina sobre células sometidas a una infección viral. Utilizando el sistema línea celular MDBK/virus VSV, se optimizó el tiempo de incubación de las células con el rhIFN-α2b antes del agregado del virus, obteniéndose un menor límite de detección luego de 6 h de incubación. Posteriormente, se determinó el CV inter e intra-ensayo de dos variantes de la técnica, obteniéndose una mayor reproducibilidad cuando se determinó la actividad antiviral sobre una monocapa celular cultivada durante 24 h previas al desarrollo del ensayo. El ensayo optimizado exhibió un rango lineal comprendido entre 1,25 y 5 UI.ml⁻¹ de rhIFN-α2b con una sensibilidad de 2,20 ml.UI⁻¹. Finalmente, se evaluó la sensibilidad de la línea celular WISH, de origen humano, en el ensayo optimizado, obteniéndose un límite de detección diez veces superior con respecto a la línea celular MDBK, lo que invalidó su empleo como reactivo.

La medición de la actividad antiproliferativa del rhIFN-α2b se realizó mediante la cuantificación de los efectos que la citoquina induce sobre la viabilidad y proliferación de la línea celular Daudi. La optimización de las condiciones experimentales estableció un ensayo basado en la incubación de la citoquina con un inóculo inicial de 5.000 células Daudi durante 96 h,

obteniéndose un rango lineal de trabajo comprendido entre 0,78 y 12,50 UI.ml⁻¹ de rhIFN- α 2b, con una sensibilidad de 0,16 ml.UI⁻¹.

El análisis teórico realizado con el fin de identificar las posiciones aminoacídicas más convenientes para generar los sitios consenso de *N*-glicosilación determinó la construcción de 14 muteínas del rhIFN- α 2b con un sitio potencial de *N*-glicosilación. Este estudio tuvo como fundamento la selección de mutaciones puntuales que generasen tripéptidos consenso con una alta probabilidad de glicosilación, sin afectar la actividad biológica de la citoquina.

En concordancia con datos encontrados en la bibliografía (Elliot y col., 2004), la expresión transitoria de las muteínas con un único sitio potencial de *N*-glicosilación en células CHO demostró que la introducción del tripéptido consenso Asn-Xxx-Ser/Thr es condición necesaria pero no suficiente para que se produzca la adición de los carbohidratos, siendo muchas veces impredecible la influencia del microambiente sobre el proceso de glicosilación. Por ejemplo, aunque se predijo una alta eficiencia de *N*-glicosilación para la variante rhIFN- α 2bR12N, este sitio fue glicosilado de manera ineficiente (< 5%). Contrariamente, el análogo rhIFN- α 2bP4N evidenció un alto grado de *N*-glicosilación (> 65%), a pesar de que el resto de los sitios cercanos a ambos extremos de la proteína mostraron una menor proporción de moléculas glicosiladas, como se ha reportado para un gran número de glicoproteínas (Gavel y von Heijne, 1990). Por otro lado, las dos variantes en las cuales se sustituyó el residuo Phe67 (rhIFN- α 2bF67N y rhIFN- α 2bF67T), cuya accesibilidad al solvente es nula, se expresaron en muy bajos niveles en los sobrenadantes de cultivo, probablemente debido a un mecanismo de control que evita la exportación de moléculas plegadas incorrectamente (Trombetta y Parodi, 2003). Las muteínas restantes mostraron un grado de *N*-glicosilación variable, que además denotó diferencias en la máxima masa molecular alcanzada, probablemente a causa de distintas estructuras de los oligosacáridos adicionados.

Por otra parte, la mayoría de las muteínas con un sitio de *N*-glicosilación expresadas transitoriamente en células CHO conservaron una actividad biológica específica antiviral similar a la reportada para la citoquina *wild type*, con excepción de la variante rhIFN- α 2bL95T, que además evidenció un descenso en su actividad específica antiproliferativa. La muteína rhIFN- α 2bR23N también exhibió una menor capacidad inhibitoria del crecimiento, pese a que conservó intacta su función antiviral. Este resultado indica que, probablemente, existan diferentes mecanismos de activación de ambas funciones biológicas del rhIFN- α 2b, los cuales dependen de la afinidad de la molécula hacia ambas subunidades del receptor.

La comparación de la eficiencia de glicosilación y la actividad biológica específica de las 14 muteínas construidas permitió seleccionar las posiciones más adecuadas para incorporar, de manera secuencial, múltiples sitios de *N*-glicosilación en la molécula de rhIFN- α 2b. En primer lugar, se construyó una variante con dos sitios de *N*-glicosilación (rhIFN- α 2b2N), mediante la introducción simultánea de las mutaciones P4N y D77N. Ambas variantes habían demostrado los mayores niveles de *N*-glicosilación (\approx 65% y 70%, respectivamente), conservando intactas ambas funciones biológicas de la citoquina. Posteriormente, se adicionó la mutación R23N para construir una variante con tres sitios de *N*-glicosilación (rhIFN- α 2b3N), dado que a pesar de su menor actividad antiproliferativa, demostró un alto grado de glicosilación (\approx 55%). La muteína con cuatro sitios de *N*-glicosilación (rhIFN- α 2b4N) se obtuvo mediante la sustitución K70N, mientras que la variante con cinco sitios (rhIFN- α 2b5N) surgió de la sustitución E113N.

Las transfecciones transitorias destinadas a evaluar la calidad de las moléculas hiperglicosiladas demostraron, por un lado, un incremento progresivo de la masa molecular de las muteínas conforme al aumento del número de sitios de *N*-glicosilación incorporados,

acompañado por una disminución de las glicofomas de menor masa molecular. De esta manera, mediante SDS-PAGE y *Western blot*, se observó que la máxima masa molecular alcanzada para las variantes rhIFN- α 2b4N y rhIFN- α 2b5N fue de aproximadamente 43 kDa, sin diferencias apreciables entre ellas. Por otra parte, la actividad biológica específica antiviral de las muteínas disminuyó gradualmente en forma concomitante con la adición de nuevos sitios consenso, conservando la molécula rhIFN- α 2b5N un 10% de la actividad biológica específica correspondiente a la proteína nativa. La introducción de mutaciones en la estructura proteica o la presencia de oligosacáridos afectaron en mayor medida la actividad biológica antiproliferativa de las citoquinas, la cual demostró una notable reducción, especialmente luego de la sustitución R23N.

Con el fin de obtener líneas celulares estables que expresen los diferentes derivados del rhIFN- α 2b, se realizaron transfecciones de células CHO y posterior clonado por técnica de dilución límite. Las productividades específicas de los clones aislados, determinadas por técnica de ELISA *sandwich*, oscilaron entre 0,4 y 70 ng.10⁶cél.día⁻¹. Se seleccionaron los clones más productores de cada variante para realizar la producción de las correspondientes muteínas a mayor escala.

Las condiciones de producción se optimizaron previamente empleando el clon D77N1C6, productor de la variante con un sitio de *N*-glicosilación rhIFN- α 2bD77N. De esta manera, se encontró que la productividad específica fue superior en la fase de crecimiento estacionario, lo que permitió crecer las células hasta obtener una monocapa y realizar posteriormente recambios de medio de cultivo, constituyendo, además, una ventaja operativa. Por otra parte, se logró disminuir el SFB desde 5% (V/V) (condición estándar para el cultivo de células CHO en nuestro laboratorio) hasta 0,5% (V/V), lo cual facilitó posteriormente el proceso de purificación. Finalmente, se determinó como intervalo de tiempo óptimo entre recambios de medio de cultivo un período de 48 h, ya que de esta manera la producción acumulada fue semejante a la obtenida mediante recambios cada 24 h, con la ventaja de alcanzar mayores concentraciones en los sobrenadantes de cultivo.

La purificación de los derivados del rhIFN- α 2b a partir de los sobrenadantes de cultivo se realizó mediante cromatografía de inmunoafinidad, la cual también fue puesta a punto para la variante rhIFN- α 2bD77N.

En primera instancia, se prepararon tres matrices de inmunoafinidad utilizando los mAbs CA1A3, CA5E6 y CB15D7, los cuales fueron seleccionados en base a su capacidad para reconocer a la mayoría de las 14 muteínas con un sitio de *N*-glicosilación y a su elevada constante de afinidad hacia la molécula no glicosilada. Los mAbs fueron producidos en líquido ascítico de ratón y purificados mediante cromatografía de afinidad a proteína A, obteniéndose recuperaciones moderadas (que oscilaron entre 28 y 57%), con una pureza aceptable para su utilización como ligandos de afinidad. El acoplamiento a la resina de *Sepharose* activada con bromuro de cianógeno fue exitoso, superando en todos los casos el 97%.

La evaluación de la *performance* de las tres matrices inmunoabsorbentes señaló al mAb CA5E6 como ligando adecuado para la purificación de la variante rhIFN- α 2bD77N. Dicha matriz, que presentó una moderada recuperación en la etapa de elución (54,8%), con mínimas pérdidas en el *flowthrough* y en los lavados, permitió obtener un elevado factor de purificación (1.298) y una pureza del 85%. Además, se observó una distribución de glicofomas muy similar en la muestra sin purificar y en la recuperada en la elución, indicando la ausencia de unión selectiva del mAb a determinadas isoformas de la citoquina. La elevada afinidad del mAb CA1A3 hacia la molécula no glicosilada ($1,4 \cdot 10^{10} \pm 0,1 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$) determinó que no se produjera una recuperación

significativa de la muteína durante el proceso (7,5%) permaneciendo retenida por el inmunoabsorbente, mientras que un 75,9% de la citoquina adsorbida a la matriz CB15D7-*Sepharose* se eliminó durante el lavado 2, sin recuperación significativa de la misma en la elución.

Con el fin de mejorar la desorción del rhIFN- α 2bD77N de la resina CA5E6-*Sepharose*, se realizó un estudio de la capacidad elutoria de diferentes soluciones. La mejor estrategia de elución fue la disminución del pH, obteniéndose recuperaciones crecientes conforme al aumento de la acidez de las soluciones empleadas. El incremento de pH, de fuerza iónica y el uso de solventes orgánicos no produjo la desorción de la citoquina en cantidades significativas (rendimientos cercanos al 1%), mientras que la elución a pH ácido con detención del flujo o mediante el agregado de dioxano disminuyó la recuperación con respecto a la obtenida al mismo pH a flujo continuo. La estrategia seleccionada para la etapa de elución de la citoquina fue el empleo de glicina 100 mM pH 2, para la cual se obtuvo un rendimiento cercano al 100%, sin producirse desprendimiento del ligando durante el proceso y conservándose intacta la actividad biológica específica de la citoquina con respecto a la de la muestra sembrada.

La purificación de los análogos del rhIFN- α 2b con un número variable de sitios de *N*-glicosilación se llevó a cabo utilizando el protocolo de cromatografía de inmunoafinidad optimizado. Todas las muteínas fueron captadas por la matriz CA5E6-*Sepharose*, sin pérdidas significativas en el *flowthrough* o en los lavados, lo que sugiere que no se produjo un cambio importante en la afinidad del mAb hacia los análogos glicosilados. Se obtuvieron rendimientos cercanos al 100%, con una pureza entre 75 y 88%. El perfil de isoformas y la actividad biológica específica de las citoquinas recuperadas en la elución fueron muy similares a los de las muestras sembradas.

La heterogeneidad, en cuanto al número y carga, de las variantes glicosiladas del rhIFN- α 2b purificadas fue analizada mediante focalización isoelectrica. La citoquina no glicosilada producida en *E. coli* consistió en una única banda de un punto isoelectrico cercano al límite superior del gradiente de pH (6,5), mientras que la proteína *wild type* mostró dos bandas correspondientes a diferentes isoformas *O*-glicosiladas. La adición sucesiva de cada nuevo sitio de *N*-glicosilación resultó en la aparición de una nueva serie de isoformas más ácidas, como consecuencia del aumento del contenido de ácido siálico debido a la presencia de nuevas cadenas de carbohidratos.

Teniendo en cuenta el principal objetivo de la estrategia de glicoingeniería aplicada, se estudió la influencia de los hidratos de carbono sobre las propiedades farmacocinéticas del rhIFN- α 2b en animales de experimentación. De esta manera, se demostró que la introducción de múltiples sitios de *N*-glicosilación fue utilizada exitosamente para construir variantes hiperglicosiladas con mayor vida media en circulación en comparación con la citoquina no modificada.

Utilizando la vía subcutánea, se observó una prolongación de la fase de absorción y distribución de los análogos del rhIFN- α 2b en forma concomitante a la introducción de nuevos sitios de glicosilación, ya sea mediante la adición de *O*-glicanos como de *N*-glicanos. De la misma manera, las muteínas con un número creciente de cadenas de carbohidratos evidenciaron mayores tiempos de vida media de eliminación. No obstante, en ambas fases de la cinética *in vivo*, sólo se encontraron diferencias significativas entre los parámetros obtenidos luego de la adición del tercer sitio de *N*-glicosilación en comparación con la proteína no modificada. Además, la mejora más notable se logró para las variantes rhIFN- α 2b4N y rhIFN- α 2b5N, las cuales mostraron un incremento de aproximadamente 25 veces en el $t_{1/2elim}$ y una disminución de

20 veces en el CL_{app} con respecto a la citoquina no glicosilada, sin observarse diferencias significativas entre ellas, en concordancia con su similar patrón de glicosilación. Por otro lado, para ambas variantes se obtuvieron características farmacocinéticas levemente mejoradas con respecto a las de la citoquina rhIFN- α 2b-PEG12kDa.

Mediante la vía endovenosa, se estudió el comportamiento farmacocinético de las variantes rhIFN- α 2b1N y rhIFN- α 2b4N en comparación con la proteína no glicosilada, con el fin de eliminar la contribución del proceso de absorción desde el sitio de administración hacia el torrente sanguíneo. El rhIFN- α 2b no glicosilado fue depurado de la circulación más rápidamente que la citoquina rhIFN- α 2b4N tanto en la fase de distribución como en la fase de eliminación, lo que determinó que el *clearance* sistémico de la citoquina hiperglicosilada fuese 8,5 veces inferior. Contrariamente, no se detectaron diferencias significativas entre los parámetros farmacocinéticos de la muteína con un sitio de *N*-glicosilación en comparación con su contraparte no glicosilada, indicando que un mínimo contenido de glúcidos sería necesario para eludir los mecanismos mediante los cuales la citoquina es removida del organismo. Nuevamente, se observaron mínimas diferencias entre la cinética *in vivo* de la variante hiperglicosilada y la citoquina pegilada mediante esta ruta de administración.

Considerando que uno de los mecanismos de eliminación del rhIFN- α 2b es la proteólisis e inactivación por proteasas séricas, se evaluó la estabilidad *in vitro* del rhIFN- α 2b4N en plasma de rata a 37°C. Se observó que la actividad antiviral del rhIFN- α 2b4N disminuyó más lentamente que la correspondiente a la citoquina no modificada. Mientras que el rhIFN- α 2b no glicosilado mostró una actividad antiviral residual cercana al 10% luego de 96 h de incubación, la molécula hiperglicosilada conservó un 60% de su actividad inicial, mostrando un comportamiento similar al de la citoquina pegilada. El tratamiento de todas las variantes de rhIFN- α 2b con proteasas específicas demostró una mayor resistencia del rhIFN- α 2b4N a la acción de la elastasa leucocitaria en comparación con el resto de las citoquinas. Estos resultados indican que la glicosilación puede incrementar la estabilidad de glicoproteínas *in vitro* mediante un aumento de su resistencia a la degradación por proteasas, probablemente a través del encubrimiento de sitios de clivaje, lo cual podría constituir una de las causas de la mayor estabilidad del rhIFN- α 2b4N en plasma de rata. Este comportamiento podría reflejarse positivamente sobre la farmacocinética de la molécula *in vivo*, sumado al resto de los efectos que contribuyen al retraso de la eliminación plasmática de la citoquina mediados por la presencia de carbohidratos.

La actividad antitumoral *in vivo* de la citoquina rhIFN- α 2b4N fue evaluada en ratones inmunocomprometidos. El tratamiento de tumores sólidos de células de origen prostático (PC-3) con una dosis semanal de $3 \cdot 10^5$ UI de la citoquina hiperglicosilada produjo una disminución de la velocidad de crecimiento de los tumores, en comparación con el mismo esquema de tratamiento con el rhIFN- α 2b no glicosilado. De esta manera, luego de finalizar el tratamiento, los tumores del grupo tratado con el rhIFN- α 2b4N demostraron un 40% del peso promedio correspondiente al grupo control. Además, en concordancia con la similitud de sus perfiles farmacocinéticos, no se observaron diferencias significativas en el volumen y el peso promedio de los tumores del grupo tratado con rhIFN- α 2b-PEG12kDa con respecto al grupo tratado con el rhIFN- α 2b4N. Otro régimen de tratamiento, consistente en una dosis semanal de $1 \cdot 10^5$ UI de ambas citoquinas en una única inyección para el rhIFN- α 2b4N y repartida en tres inyecciones para el rhIFN- α 2b no glicosilado, demostró resultados similares. Estos resultados sugieren que el incremento de la vida media plasmática del rhIFN- α 2b4N con respecto a su análogo aglicosilado se manifiesta en una mayor actividad antitumoral *in vivo*.

Los hallazgos encontrados permiten concluir que la estrategia de glicoingeniería aplicada para el rhIFN- α 2b produce una importante mejora de las propiedades farmacocinéticas de la citoquina, así como de su estabilidad *in vitro*, lo que en conjunto contribuye a un incremento de su eficacia terapéutica. El desarrollo biotecnológico llevado a cabo permitiría proyectar un nuevo agente terapéutico que posibilite una dosis y frecuencia de administración menor a la correspondiente a la terapia con la proteína no modificada, lo cual conduciría a una disminución de los efectos secundarios indeseados, mejorando así la calidad de vida del paciente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, A.; Strander, H.; Cantell, K. (1975) *Sensitivity of the Epstein-Barr virus transformed human lymphoid cell lines to interferon*. J.Gen.Virol. 28: 207-217.
- Adolf, G.R.; Kalsner, I.; Ahorn, H.; Maurer-Fogy, I.; Cantell, K. (1991) *Natural human interferon- α 2 is O-glycosylated*. Biochem.J. 276: 511-518.
- Ahmad, S.; Gromiha, M.; Fawareh, H.; Sarai, A. (2004) *ASAview: Database and tool for solvent accesibility representation in proteins*. BMC Bioinformatics 5: 51-55.
- Allen, G.; Fantes, K.H. (1980) *A family of structural genes for human lymphoblastoid (leukocyte-type) interferon*. Nature 287: 408-411.
- Allen, G. (1982) *Structure and properties of human interferon- α from Namalwa lymphoblastoid cells*. Biochem. J. 207: 397-408.
- Amadeo, I. (2003) Tesis Doctoral: *Purificación de eritropoyetina humana recombinante: desarrollo de diferentes estrategias y escalamiento de procesos*. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL. Santa Fe, Argentina.
- Arduini, R.M.; Strauch, K.L.; Runkel, L.A.; Carlson, M.M.; Hronowski, X.; Foley, S.F.; Young, C.N.; Cheng, W.; Hochman, P.S.; Baker, D.P. (1999) *Characterization of a soluble ternary complex formed between human interferon-beta-1a and its receptor chain*. Protein Sci. 8: 1867-1877.
- Arduini, R.M.; Li, Z.; Rapoza, A.; Gronke, R.; Hess, D.M.; Wen, D.; Miatkowski, K.; Coots, C.; Kaffashan, A.; Viseux, N.; Delaney, J.; Domon, B.; Young, C.N.; Boynton, R.; Chen, L.L.; Chen, L.; Betzenhauser, M.; Miller, S.; Gill, A.; Pepinsky, R.B.; Hochman, P.S.; Baker, D.P. (2004) *Expression, purification, and characterization of rat interferon- β , and preparation of an N-terminally PEGylated form with improved pharmacokinetic parameters*. Protein Expr. Purif. 34: 229-242.
- Baenziger, J.U. (1996) *Glycosylation: to what end for the glycoprotein hormones?* Endocrinology 137 (5): 1520-1522.
- Bailon, P.; Berthold, W. (1998) *Polyethylene glycol-conjugated pharmaceutical proteins*. Pharm. Sci. Technol. Today 1 (8): 352-356.
- Bailon, P.; Palleroni, A.; Schaffer, C.A.; Spence, C.L.; Fung, W.; Porter, J.E.; Ehrlich, G.K.; Pan, W.; Xu, Z.; Modi, M.W.; Farid, A.; Berthold, W. (2001) *Rational design of a potent, long-lasting form of interferon: a 40 kDa branched polyethyleneglycol-conjugated interferon- α -2a for the treatment of hepatitis C*. Bioconjugate Chem. 12: 195-202.
- Bank, U.; Ansorge, S. (2001) *More than destructive: neutrophil-derived serine proteases in cytokine bioactivity control*. J. Leukoc. Biol. 69: 197-206.
- Baumann, A. (2006) *Early Development of therapeutic biologics - Pharmacokinetics*. Curr. Drug Metab. 7: 15-21.
- Bekisz, J.; Schmeisser, H.; Hernandez, J.; Goldman, N.; Zoon, K. (2004) *Human interferons alpha, beta and omega*. Growth factors 22 (4): 243-251.
- Billiau, A. (2006) *Interferon: the pathways of discovery I. Molecular and cellular aspects*. Cytokine Growth Factor Rev. 17: 381-409.

- Bino, T.; Madar, Z.; Gertler, A.; Rosenberg, H. (1982) *The kidney is the main site of interferon degradation*. J. Interferon Res. 2 (29): 301-308.
- Borden, E.C.; Hogan, T.F.; Voelkel, J.G. (1982) *Comparative antiproliferative activity in vitro of natural interferons alpha and beta for diploid and transformed human cells*. Cancer Res. 42 (12): 4948-4953.
- Borden, E.C.; Lindner, D.; Dreicer, R.; Hussein, M.; Peereboom, D. (2000) *Second-generation interferons for cancer: clinical targets*. Semin. Cancer Biol. 10: 125-144.
- Bradford, M. (1976) *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- Brassard, D.L.; Grace, M.J.; Bordens, R.W. (2002) *Interferon- α as an immunotherapeutic protein*. J. Leukoc. Biol. 71: 565-581.
- Burgon, P.G.; Stanton, P.G.; Robertson, D.M. (1996) *In vivo bioactivities and clearance patterns of highly purified human luteinizing hormone isoforms*. Endocrinology 137 (11): 4827-4836.
- Butler, M. (1988) *Processes with animal cell and tissue cultures*. En: *Biotechnology, Vol. 6b. Special microbial processes*. (Eds.; Rehm, H.J., Reed, G.). VCH Publisher, Weinheim, Alemania, cap. 10, p. 252-316.
- Cantell, K.; Hirvonen, S.; Sareneva, T.; Pirhonen, J.; Julkunen, I. (1992) *Differential inactivation of interferons by a protease from human granulocytes*. J. Interferon Res. 12, 177-183.
- Carbone, C.; Maschi, F. (2006) *El ratón nude (nu/nu) como modelo animal de inmunodeficiencia*. Qviva 5 (1): 19-23.
- Carter, C.R.D.; Whitmore, K.M.; Thorpe, R. (2004) *The significance of carbohydrates on G-CSF: differential sensitivity of G-CSFs to human neutrophil elastase degradation*. J. Leukoc. Biol. 75: 515-522.
- Casalis, P. (2004) *Tesina de Licenciatura en Biotecnología: Obtención y caracterización de un panel de anticuerpos monoclonales anti-interferón alfa 2b humano recombinante (rhIFN- α 2b)*. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL. Santa Fe, Argentina.
- Chamorey, A.L.; Magné, N.; Pivot, X.; Milano, G. (2002) *Impact of glycosylation on the effects of cytokines. A special focus on oncology*. Eur. Cytokine Netw. 13 (2): 154-160.
- Chavin, S.I.; Weidner, S.M. (1984) *Blood clotting factor IX. Loss of activity after cleavage of sialic acid residues*. J. Biol. Chem. 259 (6): 3387-3390.
- Chill, J.H.; Quadt, S.R.; Levy, R.; Schreiber, G.; Anglister, J. (2003) *The human type I interferon receptor: NMR structure reveals the molecular basis of ligand binding*. Structure 11: 791-802.
- Chuntharapai, A.; Gibbs, V.; Lu, J.; Ow, A.; Marsters, S.; Ashkenazi, A.; De Vos, A.; Jin Kim, K. (1999) *Determination of residues involved in ligand binding and signal transmission in the human IFN- α receptor 2*. J. Immunol. 163: 766-773.
- Cohen, S.N.; Chang, A.C.Y.; Hsu, L. (1972) *Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA*. Proc. Natl. Acad. Sci. 69: 2110-2114.
- Coligan, J.E.; Kruisbeeck, A.M.; Margulies, D.H.; Shevach, E.M.; Strober, W. (1996) En: *Current Protocols in Immunology*. Supplement 18. John Wiley and Sons, Chichester, Inglaterra, p. 8.2.1-8.2.9.
- Cook, J.; Mitchell, J. (1989) *Viability measurements in mammalian systems*. Anal. Biochem. 179: 1-7.

- Cuatrecasas, P.; Wilchek, M.; Anfinsen, C. (1968) *Selective enzyme purification by affinity chromatography*. *Biochemistry* 61: 636-643.
- Cumming, D.A. (1991) *Glycosylation of recombinant protein therapeutics: control and functional implications*. *Glycobiology* 1 (2): 115-130.
- D'Antonio, M.; Borrelli, F.; Datola, A.; Bucci, R.; Mascia, M.; Polletta, P.; Piscitelli, D.; Papoian, R. (1999) *Biological characterization of recombinant human follicle stimulating hormone isoforms*. *Hum. Reprod.* 14: 1160-1167.
- De Maeyer, E.; De Maeyer-Guignard, J. (1994) *Interferons*. En: *The cytokine handbook*, 2nd ed. (Ed.: Thompson, A.W.). Academic Press Limited, San Diego, EE.UU., cap. 15, p. 265-288.
- Demers, G.W.; Johnson, D.E.; Machefer, T.; Looper, L.D.; Batinica, A.; Beltran, J.C.; Sugarman, B.J.; Howe, J.A. (2002) *Tumor growth inhibition by interferon- α using PEGylated protein or adenovirus gene transfer with constitutive or regulated expression*. *Mol. Ther.* 6 (1): 50-56.
- Depetris, M. (2008) Tesis doctoral: *Obtención de anticuerpos recombinantes anti-IFN- α 2b destinados a uso terapéutico humano*. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL. Santa Fe, Argentina.
- de Veer, M.J.; Holko, M.; Frevel, M.; Walker, E.; Der, S.; Paranjape, J.M.; Silverman, R.H.; Williams, B.R. (2001) *Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays*. *J. Leukoc. Biol.* 69: 912-920.
- Díaz, M.O. (1995) *The human type I interferon gene cluster*. *Semin. Virol.* 6: 143-149.
- Donnelly, R.J. (1994) *The type I ($\alpha/\beta/\omega/\tau$) interferon family*. En: *Guidebook to cytokines and their receptors*. (Ed.: Nicola, N.A.). Oxford University Press, Oxford, Inglaterra, p. 111-114.
- Dorr, R.T. (1993) *Clinical properties of yeast-derived versus Escherichia coli-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*. *Clin. Ther.* 15(1):19-29.
- Egrie, J.C.; Browne, J.K. (2001) *Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP)*. *Nephrol. Dial. Transplant* 16 (3): 3-13.
- Egrie, J.C.; Dwyer, E.; Browne, J.K.; Hitz, A.; Lykos, M.A. (2003) *Darbepoetin alfa has a longer circulating half-life and greater in vivo potency than recombinant human erythropoietin*. *Exp. Hematol.* 31: 290-299.
- Ehrman, D.A.; Weinber, M.; Sarne, D.H. (1989) *Limitations to the use of sensitive assays for serum thyrotropin in the assessment of thyroid status*. *Arch. Intern. Med.* 149: 369-372.
- Einhorn, S.; Grander, D. (1996) *Why do so many cancer patients fail to respond to interferon therapy?* *J. Interferon Cytokine Res.* 16 (4): 275-281.
- Ekins, R. (1989) *A shadow over immunoassay*. *Nature* 340: 256-258.
- Elliot, S.; Lorenzini, T.; Asher, S.; Aoki, K.; Brankow, D.; Buck, L.; Busse, L.; Chang, D.; Fuller, J.; Grant, J.; Hernday, N.; Hokum, M.; Hu, S.; Knudten, A.; Levin, N.; Komorowski, R.; Martin, F.; Navarro, R.; Osslund, T.; Rogers, G.; Rogers, N.; Trail, G.; Egrie, J. (2003) *Enhancement of therapeutic protein in vivo activities through glycoengineering*. *Nat. Biotechnol.* 21: 414-421.
- Elliot, S.; Chang, D.; Delorme, E.; Eris, T.; Lorenzini, T. (2004) *Structural requirements for additional N-linked carbohydrate on recombinant human erythropoietin*. *J. Biol. Chem.* 279 (16): 16854-16862.

- Esser, U.; Unger, K.K. (2000) *Reversed-phase chromatography*. En: *High-Performance Liquid Chromatography of peptides and proteins: separation, analysis and conformation*. (Eds.: Mant, C.T., Hodges, R.S.). CRC Press, Florida, EE.UU., sección V, p. 273-278.
- Evinger, M.; Rubinstein, M.; Pestka, S. (1981) *Antiproliferative and antiviral activities of human leukocyte interferons*. Arch. Biochem. Biophys. 210 (1): 319-329.
- Ey, P.L.; Prowse, S.J.; Jenkin, C.R. (1978) *Isolation of pure IgG₁, IgG_{2a}, and IgG_{2b} immunoglobulins from mouse serum using protein A Sepharose*. Biochemistry 15: 429-436.
- Familletti, P.C.; Rubinstein, S.; Pestka, S. (1981) *A convenient and rapid cytopathic effect inhibition assay for interferon*. Methods Enzymol. 78: 387-394.
- Felgner, P.; Gadek, T.; Holm, M.; Roman, R.; Chan, H.W.; Wenz, M.; Northrop, J.P.; Ringold, G.M.; Danielsen, M. (1987) *Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-7417.
- Fernandes, A.I.; Gregoriadis, G. (2001) *The effect of polysialylation on the immunogenicity and antigenicity of asparaginase: implication in its pharmacokinetics*. Int. J. Pharm. 217: 215-224.
- Folkman, J.; Shing, Y. (1992) *Angiogenesis*. J. Biol. Chem. 267 (16): 10931-10934.
- Forno, G. (2004) Tesis Doctoral: *Desarrollo de distintas estrategias de purificación y estudio del patrón de glicosilación de proteínas recombinantes de uso terapéutico*. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL. Santa Fe, Argentina.
- Foser, S.; Schacher, A.; Weyer, K.A.; Brugger, D.; Dietel, E.; Marti, S.; Schreitmüller, T. (2003). *Isolation, structural characterization, and antiviral activity of positional isomers of monopegylated interferon α -2a (PEGASYS)*. Protein Expr. Purif. 30: 78-87.
- Foster, G.R.; Finter, N.B. (1998) *Are all type I human interferons equivalent?* J. Viral Hepat. 5 (3): 143-152.
- Freshney, R. (2000a) *Cell lines*. En: *Culture of animal cells. A manual of basic technique*. Wiley-Liss Inc, New Jersey, EE.UU., cap. 12, p. 177-193.
- Freshney, R. (2000b) *Cryopreservation*. En: *Culture of animal cells. A manual of basic technique*. Wiley-Liss Inc, New Jersey, EE.UU., cap. 16, p. 297-308.
- Freshney, R. (2000c) *Cloning and selection*. En: *Culture of animal cells. A manual of basic technique*. Wiley-Liss Inc, New Jersey, EE.UU., cap. 13, p. 195-213.
- Freshney, R. (2000d) *Serum-free media*. En: *Culture of animal cells. A manual of basic technique*. Wiley-Liss Inc, New Jersey, EE.UU., cap. 9, p. 105-120.
- Galinsky, R.E.; Svensson, C.K. (1995) *Farmacocinética básica*. En: *Farmacía 19ª Edición*. (Ed.: Gennaro, A.R.). Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, cap. 42, p. 1070-1093.
- Gavel, Y.; von Heijne, G. (1990) *Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering*. Protein Eng. 3 (5): 433-442.
- Ghislain, J.; Sussman, G.; Goetz, S.; Ling, L.E.; Fish, E.N. (1995) *Configuration of the interferon- α/β receptor complex determines the context of the biological response*. J. Biol. Chem. 270 (37): 21785-21792.
- Gibaldi, M.; Perrier, D. (1982) *Method of residuals*. En: *Pharmacokinetics*, 2nd Edition. (Eds.: Gibaldi, M., Perrier, D.). Marcel Dekker, Inc., New York, EE.UU., apéndice C, p. 433-444.

- Goeddel, D.V.; Yelverton, E.; Ullrich, A.; Heyneker, H.L.; Miozzari, G.; Holmes, W.; Seeburg, P.H.; Dull, T.; May, L.; Stebbing, N.; Crea, R.; Maeda, S.; McCandliss, R.; Sloma, A.; Tabor, J.M.; Gross, M.; Familletti, P.C.; Pestka, S. (1980) *Human leukocyte interferon produced in E. coli is biologically active*. *Nature* 287 (2): 411-416.
- Goldenberg, M.M. (1999) *Etanercept, a novel drug for the treatment of patients with severe, active rheumatoid arthritis*. *Clin. Ther.* 21: 75-87.
- Goldwasser, E.; Kung, C.K.H.; Eliason, J. (1974) *On the mechanism of erythropoietin-induced differentiation. XIII. The role of sialic acid in erythropoietin action*. *J. Biol. Chem.* 249:4202-4206.
- Goochee, C.F.; Gramer, M.J.; Andersen, D.C.; Bahr, J.B.; Rasmussen, J.R. (1992) *The oligosaccharides of glycoproteins: factors affecting their synthesis and their influence on glycoprotein properties*. *Biotechnology* 9: 1347-1355.
- Goodbourn, S.; Didcock, L.; Randall, R.E. (2000) *Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures*. *J. Gen. Virol.* 81: 2341-2364.
- Graddis, T.J.; Remmele, R.L.Jr.; McGrew, J.T. (2002) *Designing proteins that work using recombinant technologies*. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 3 (4): 285-297.
- Green, A.E.; Athereya, B.; Lehr, H.B.; Coriell, L.L. (1967) *Viability of cultures following extended preservation in liquid nitrogen*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 124: 1302-1307.
- Gregoriadis, G.; Jain, S.; Papaioannou, I.; Laing, P. (2005) *Improving the therapeutic efficacy of peptides and proteins: a role for polysialic acids*. *Int. J. Pharm.* 300: 125-130.
- Gresser, I. (1984) *Role of interferon in resistance to viral infection in vivo*. En: *Interferon, Vol. 2: Interferons and the immune system*. (Eds.: Vilcek, J., De Maeyer, E.). Elsevier Science Publishers B.V., New York, EE.UU., cap.13, p. 221-247.
- Griffiths, B. (1986). *Scaling-up of animal cell cultures*. En: *Animal cell culture. A practical approach*. (Ed.: Freshney, R.I.). IRL Press, Oxford, Inglaterra, cap. 3, p. 33-69.
- Gupta, R.; Brunak, S. (2002) *Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function*. *Pac. Symp. Biocomput.* 7: 310-322.
- Gustafson, S.; Proper, J.A.; Bowie, E.J.W.; Sommer, S.S. (1987) *Parameters affecting the yield of DNA from human blood*. *Anal. Biochem.* 165: 294-299.
- Gutterman, J.U. (1994) *Cytokine therapeutics: Lessons from interferon α* . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1198-1205.
- Hames, B.D. (1990) *One-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis*. En: *Gel electrophoresis of proteins. A practical approach*. (Eds.: Hames, B.D., Rickwood, D.). Oxford University Press, Inc., New York, EE.UU., cap. 1, p. 1-147.
- Harlow, E.; Lane, D. (1988a) *Immunizations*. En: *Antibodies. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, EE.UU., cap. 5, p. 53-137.
- Harlow, E.; Lane, D. (1988b) *Immunoaffinity purification*. En: *Antibodies. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, EE.UU., cap. 13, p. 511-552.
- Hasegawa, T. (1996) *History and evolution of culture maintainance and preservation techniques*. En: *Maintaining cultures for biotechnology and industry*. (Eds.: Hunter-Cevera, J.C., Belt, A.). Academic Press, Inc., San Diego, EE.UU., cap. 2, p. 15-27.

- Hauser, H. (1997) *Heterologous expression of genes in mammalian cells*. En: *Mammalian cell biotechnology in protein production*. (Eds.: Hauser, H., Wagner, R.). Walter de Gruyter & Co., Berlín, Alemania, cap. 1.1, p. 3-27.
- Hawley-Nelson, P.; Ciccarone, V.; Gebevehu, G.; Jessee, J. (1993) *A new polycationic liposome reagent with enhanced activity for transfection*. *FASEB J.* 7: A167.
- Hay, R.J. (1986) *Preservation and characterisation*. En: *Animal cell culture. A practical approach*. (Ed.: Freshney, R.I.). IRL Press, Oxford, Inglaterra, cap. 4, p. 71-112.
- Hayflick, L. (1961) *The establishment of a line (WISH) of human amnion cells in continuous cultivation*. *Exp. Cell. Res.* 23: 14-20.
- Ho, S.N.; Hunt, H.D.; Horton, R.M.; Pullen, J.K.; Pease, L.R. (1989) *Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction*. *Gene* 77 (1): 51-59.
- Horton, H.; Hernandez, P.; Parker, Su.; Barnhart, K. (1999) *Antitumor effects of interferon- ω : in vivo therapy of human tumor xenografts in nude mice*. *Cancer Res.* 59: 4064-4068.
- Hounsell, E.F.; Davies, M.J.; Renouf, D.V. (1996) *O-linked protein glycosylation structure and function*. *Glycoconj. J.* 13: 19-26.
- Hu, R.; Gan, Y.; Liu, J.; Miller, D.; Zoon, K.C. (1993) *Evidence for multiple binding sites for several components of human lymphoblastoid interferon- α* . *J. Biol. Chem.* 268 (17): 12591-12595.
- Huang, S.F.; Kim, S.; Lee, A.T.; Karashima, T.; Bucana, C.; Kedar, D.; Sweeney, P.; Mian, B.; Fan, D.; Shepherd, D.; Fidler, I.J.; Dinney, C.P.; Killion, J.J. (2002) *Inhibition of growth and metastasis of orthotopic human prostate cancer in athymic mice by combination therapy with pegylated interferon- α 2b and docetaxel*. *Cancer Res.* 62: 5720-5726.
- Isaacs, A.; Lindenmann, J. (1957) *Virus interference I. The interferon*. *Proc. R. Soc. London Ser. B* 147: 258-267.
- Jaitin, D.A.; Roisman, L.C.; Jaks, E.; Gavutis, M.; Piehler, J.; Van Der Heyden, J.; Uzé, G.; Schreiber, G. (2006) *Inquiring into the differential action of interferons (IFNs): an IFN- α 2 mutant with enhanced affinity to IFNAR1 is functionally similar to IFN- β* . *Mol. Cell. Biol.* 26 (5): 1888-1897.
- Jelkmann, W. (2006) *Recombinant erythropoietins - The role of glycosylation in receptor binding, action and degradation*. Business briefing: european kidney and urological disease: 22-24.
- Jenkins, N.; Curling, E.M.A. (1994) *Glycosylation of recombinant proteins: problems and prospects*. *Enzyme Microb. Technol.* 16: 354-364.
- Jo, Y.W.; Youn, Y.S.; Lee, S.H.; Kim, B.M.; Kang, S.H.; Yoo, M.; Choi, E.C.; Lee, K.C. (2006) *Long-acting interferon- α 2a modified with a trimer-structured polyethylene glycol: preparation, in vitro bioactivity, in vivo stability and pharmacokinetics*. *Int. J. Pharm.* 309: 87-93.
- Jones, J.; Krag, S.S.; Betenbaugh, M.J. (2005) *Controlling N-linked glycan site occupancy*. *Biochim. Biophys. Acta* 1726, 121-137.
- Kaighn, M.E.; Narayan, K.S.; Ohnuki, Y.; Lechner, J.F.; Jones, L.W. (1979) *Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3)*. *Invest. Urol.* 17 (1): 16-23.
- Karpusas, M.; Whitty, A.; Runkel, L.; Hochman, P. (1998) *The structure of human interferon- β : implications for activity*. *Cell. Mol. Life Sci.* 54: 1203-1216.

- Kasturi, L.; Eshleman, J.R.; Wunner, W.H.; Shakin-Eshleman, S.H. (1995) *The hydroxy amino acid in an Asn-X-Ser/Thr sequon can influence N-linked core glycosylation efficiency and the level of expression of a cell surface glycoprotein*. J. Biol. Chem. 270 (24): 14756-14761.
- Katinger, H.; Scheirer, W. (1985) *Mass cultivation and production of animal cells*. En: *Animal Cell Biotechnology, Vol. 1*. (Eds.: Spiers, R.E., Griffiths, J.B.). Academic Press, Inc., Florida, EE.UU., cap. 7, p. 167-193.
- Kawasaki, T.; Ashwell, G. (1976) *Chemical and physical properties of an hepatic membrane protein that specifically binds asialoglycoproteins*. J. Biol. Chem. 251 (5): 1296-1302.
- Kelly, J.; Jarrell, H.; Millar, L.; Tessier, L.; Fiori, L.M.; Lau, P.C.; Allan, B.; Szymanski, C.M. (2006) *Biosynthesis of the N-linked glycan in Campylobacter jejuni and addition onto protein through block transfer*. J. Bacteriol. 188 (7): 2427-2434.
- Kilburn, D.G.; Lilly, M.D.; Webb, F.C. (1969) *The energetics of mammalian cell growth*. J. Cell Sci. 4: 645-654.
- Klaus, W.; Gsell, B.; Labhardt, A.; Wipf, B.; Senn, H. (1997) *The three-dimensional high resolution structure of human interferon α -2a determined by heteronuclear NMR spectroscopy in solution*. J. Mol. Biol. 274: 661-675.
- Klein, E.; Klein, G.; Nadkarni, J.S.; Nadkarni, J.J.; Wigzell, H.; Clifford, P. (1968) *Surface IgM-kappa specificity on a Burkitt lymphoma cell in vivo and in derived culture lines*. Cancer Res. 28 (7): 1300-1310.
- Kontsek, P. (1994) *Human type I interferons: structure and function*. Acta virol. 38: 345-360.
- Kornfeld, R.; Kornfeld, S. (1985) *Assembly of asparagine-linked oligosaccharides*. Ann. Rev. Biochem. 54: 631-664.
- Koths, K. (1995) *Recombinant proteins for medical use: the attractions and challenges*. Curr. Opin. Biotechnol. 6: 681-687.
- Koury, M.J. (2003) *Sugar coating extends half-life and improves effectiveness of cytokine hormones*. Trends biotechnol. 21 (11): 462-464.
- Kratje, R.B.; Wagner, R. (1992) *Evaluation of production of recombinant human interleukin-2 in fluidized bed bioreactor*. Biotechnol. Bioeng. 39: 233-242.
- Krim, M. (1980) *Towards tumor therapy with interferons, part I. Interferons: production and properties*. Blood 55 (5): 711-721.
- Kunzi, M.; Pitha, P. (2003) *Interferon targeted genes in host defense*. Autoimmunity 36 (8): 457-461.
- Laemmli, U.K. (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T₄*. Nature 227: 680-685.
- Lamken, P.; Lata, S.; Gavutis, M.; Piehler, J. (2004) *Ligand-induced assembling of the type I interferon receptor on supported lipid bilayers*. J. Mol. Biol. 341: 303-318.
- Laouar, A.; Villiers, C.; Sancéau, J.; Maison, C.; Colomb, M.; Wietzerbin, J.; Bauvois, B. (1993) *Inactivation of interleukin-6 in vitro by monoblastic U937 cell plasma membranes involves both protease and peptidyl-transferase activities*. Eur. J. Biochem. 215: 825-831.
- Larsen, G.R.; Metzger, M.; Henson, K.; Blue, Y.; Horgan, P. (1989) *Pharmacokinetic and distribution analysis of variant forms of tissue type plasminogen activator with prolonged clearance in rat*. Blood 73 (7): 1842-1850.

- Leelavatcharamas, V.; Emery, A.N.; al-Rubeai, M. (1994) *Growth and interferon-gamma production in batch culture of CHO cells*. Cytotechnology 15 (1-3): 65-71.
- Lefevre, F.; Guillomot, M.; D'Andrea, S.; Battegay, S.; La Bonnardiere, C. (1998) *Interferon-delta: the first member of a novel type I interferon family*. Biochimie 80: 779-788.
- Leibo, S.P.; Mazur, P. (1971) *The role of cooling rates in low-temperature preservation*. Cryobiology 8 (5): 447-452.
- Lison, L. (1976) *Datos de mediciones. Estudio de una serie de mediciones*. En: *Estadística aplicada a la biología experimental*. EUDEBA, Buenos Aires, Argentina, cap. 1, p.1-33.
- Lisowska, E. (2002) *The role of glycosylation in protein antigenic properties*. Cell. Mol. Life Sci. 59: 445-455.
- Lough, W.J.; Wainer, I.W. (1996) *Method development and quantitation*. En: *High Performance Liquid Chromatography: fundamental principles and practice*. (Eds.: Lough, W.J., Wainer, I.W.). Blackie Academic & Professional, Londres, Inglaterra, cap. 7, p. 143-167.
- Lovelock, J.E.; Bishop, M.W.H. (1959) *Prevention of freezing damage to living cells with dimethyl sulphoxide*. Nature 183: 1394-1395.
- Lu, J.; Chuntharapai, A.; Beck, J.; Bass, S.; Ow, A.; De Vos, A.M.; Gibbs, V.; Jin Kim, K. (1998) *Structure-function study of the extracellular domain of the human IFN- α receptor (hIFNAR1) using blocking monoclonal antibodies: the role of domains 1 and 2*. J. Immunol. 160: 1782-1788.
- MacDougall, I.C.; Gray, S.J.; Elston, O.; Breen, C.; Jenkins, B.; Browne, J.; Egrie, J. (1999) *Pharmacokinetics of novel erythropoiesis stimulating protein compared with epoetin alfa in dialysis patients*. J. Am. Soc. Nephrol. 10: 2392-2395.
- Madin, S.H.; Darby, N.B.Jr. (1958) *Established kidney cell lines of normal adult bovine and ovine origin*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 98: 574-576.
- Mandel, M.; Higa, A. (1970) *Calcium-dependent bacteriophage DNA infection*. J. Mol. Biol. 53 (1): 159-162.
- Margni, R. (1996) *Inmunología e inmunoquímica. Fundamentos*. (Ed.: Margni, A.). Editorial Panamericana S.A., Buenos Aires, Argentina. Apéndice III, p. 960-961.
- Marinero, J.A.; Casley, D.J.; Bach, L.A. (2000) *O-glycosylation delays the clearance of human IGF-binding protein-6 from the circulation*. Eur. J. Endocrinol. 142: 512-516.
- Marini, G.; Forno, G.; Kratje, R.; Etcheverrigaray, M. (2007) *Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: effect of glycosylation on pharmacokinetic parameters*. Electronic Journal of Biotechnology (online) 10 (2), <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol10/issue2/full/5/index.html>.
- Markoff, E.; Sigel, M.B.; Lacour, N.; Seavey, B.K.; Friesen, H.G.; Lewis, U.J. (1988). *Glycosylation selectively alters the biological activity of prolactin*. Endocrinology 123 (3): 1303-1306.
- Marshall, S.A.; Lazar, G.A.; Chirino, A.J.; Desjarlais, J.R. (2003) *Rational design and engineering of therapeutic proteins*. Drug Discov. Today 8 (5): 212-221.
- Martal, J.L.; Chêne, N.M.; Huynh, L.P.; L'Haridon, R.M.; Reinaud, P.B.; Guillomot, M.W.; Charlier, M.A.; Charpigny, S.Y. (1998) *IFN-tau: a novel subtype I IFN1. Structural characteristics, non-ubiquitous expression, structure-function relationships, a pregnancy hormonal embryonic signal and cross-species therapeutic potentialities*. Biochimie 80: 755-777.

- Mather, J.P. (1991) *Optimizing cell and culture environment for production of recombinant proteins*. En: *Methods in Enzymology, Vol. 185: Gene expression technology*. (Ed.: Goeddel, D.). Academic Press, Inc., San Diego, EE.UU., p. 567-577.
- Matthews, S.J.; McCoy, C. (2004) *Peginterferon alfa-2a: a review of approved and investigational uses*. Clin. Ther. 26 (7): 991-1025.
- Meager, A. (2002) *Biological assays for interferons*. J. Immunol. Methods 261: 21-36.
- Milano, F. (2001) Tesina de Licenciatura en Biotecnología: *Diseño y validación de bioensayos para la valoración biológica in vitro de fármacos*. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL. Santa Fe, Argentina.
- Mire-Sluis, A.R. (1995a) *Immunoassays for detecting cytokines: What are they really measuring?* J. Immunol. Methods 186: 157-160.
- Mire-Sluis, A.R.; Page, L.; Thorpe, R. (1995b) *Quantitative cell line based bioassays for human cytokines*. J. Immunol. Methods 187: 191-199.
- Mire-Sluis, A.R.; Page, L.A.; Meager, A.; Igaki, J.; Lee, J.; Lyons, S.; Thorpe, R. (1996) *An anti-cytokine bioactivity assay for interferons- α , - β y - ω* . J. Immunol. Methods 195: 55-61.
- Mire-Sluis, A.R. (1999) *Cytokines: from technology to therapeutics*. Trends Biotechnol. 17 (8): 319-325.
- Mire-Sluis, A.R. (2001) *Progress in the use of biological assays during the development of biotechnology products*. Pharm. Res. 18 (9): 1239-1246.
- Montreuil, J.; Bouquelet, S.; Debray, H.; Lemoine, J.; Michalski, J.; Spik, G.; Strecker, G. (1994) *Glycoproteins*. En: *Carbohydrate analysis. A practical approach*. (Eds.: Chaplin, M.F., Kennedy, J. K.). Oxford University Press, New York, EE.UU., cap. 5, p.181-293.
- Morell, A.G.; Gregoriadis, G.; Scheinberg, H. (1971) *The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation*. J. Biol. Chem. 246 (5): 1461-1467.
- Nadkarni, J.S.; Nadkarni, J.J.; Clifford, P.; Manolov, G.; Fenyo, E.M.; Klein, E. (1969) *Characteristics of new cell lines derived from Burkitt lymphomas*. Cancer 23 (1): 64-79.
- Nederman, T.; Karlström, E.; Sjödin, L. (1990) *An in vitro bioassay for quantitation of human interferons by measurements of antiproliferative activity on a continuous human lymphoma cell line*. Biologicals 18 (1): 29-34.
- Neurath, H. (1990) *The diversity of proteolytic enzymes*. En: *Proteolytic enzymes. A practical approach*. (Eds.: Beynon, R.J., Bond, J.S.). IRL Press, Oxford University Press, Oxford, Inglaterra, cap. 1, p. 1-13.
- Nilsson, I.; von Heijne, G. (2000) *Glycosylation efficiency of Asn-Xaa-Thr sequons depends both on the distance from the C terminus and on the presence of a downstream transmembrane segment*. J. Biol. Chem. 275 (23): 17338-17343.
- Nyman, T.A.; Tölö, H.; Parkkinen, J.; Kalkkinen, N. (1998a) *Identification of nine interferon- α subtypes produced by Sendai virus-induced human peripheral blood leukocytes*. Biochem. J. 329: 295-302.
- Nyman, T.A.; Kalkkinen, N.; Tölö, H.; Helin, J. (1998b) *Structural characterisation of N-linked and O-linked oligosaccharides derived from interferon- α 2b and interferon- α 14c produced by Sendai-virus-induced human peripheral blood leukocytes*. Eur. J. Biochem. 253: 485-493.

- Oggero, M. (2002) Tesis Doctoral: *Estudio del Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos humano recombinante (rhGM-CSF) producido en diferentes sistemas huésped mediante el uso de anticuerpos monoclonales*. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL, Santa Fe, Argentina.
- Oh-Eda, M.; Hasegawa, M.; Hattori, K.; Kuboniwa, H.; Kojima, T.; Orita, T.; Tomonou, K.; Yamazaki, T.; Ochi, N. (1990) *O-linked sugar chain of human granulocyte colony-stimulating factor protects it against polymerization and denaturation allowing it to retain its biological activity*. J. Biol. Chem. 265:11432-11435.
- Opdenakker, G.; Rudd, P.M.; Ponting, C.P.; Dwek, R.A. (1993) *Concepts and principles of glycobiology*. FASEB J. 7: 1330-1337.
- Osborn, B.L.; Olsen, H.S.; Nardelli, B.; Murray, J.H.; Zhou, J.X.H.; García, A.; Moody, G.; Zaritskaya, L.S.; Sung, C. (2002) *Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of a human serum Albumin-Interferon- α fusion protein in cynomolgus monkeys*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 303 (2): 540-548.
- Paige, A.G.; Whitcomb, K.L.; Liu, J.; Kinstler, O. (1995) *Prolonged circulation of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor by covalent linkage to albumin through a heterobifunctional polyethylene glycol*. Pharm. Res. 12: 1883-1888.
- Pan, Y.; Kytola, S.; Farnebo, F.; Wang, N.; Lui, W.O.; Nupponen, N.; Isola, J.; Visakorpi, T.; Bergerheim, U.S.; Larsson, C. (1999) *Characterization of chromosomal abnormalities in prostate cancer cell lines by spectral karyotyping*. Cytogenet. Cell Genet. 87 (3-4): 225-232.
- Pantelouris, E.M. (1971) *Observations on the immunobiology of "nude" mice*. Immunology 20: 247-252.
- Peleg-Shulman, T.; Tsubery, H.; Mironchik, M.; Fridkin, M.; Schreiber, G.; Shechter, Y. (2004) *Reversible PEGylation: a novel technology to release native interferon $\alpha 2$ over a prolonged time period*. J. Med. Chem. 47: 4897-4904.
- Pepinsky, R.B.; Lepage, D.J.; Gill, A.; Chakraborty, A.; Vaidyanathan, S.; Green, M.; Baker, D.P.; Whalley, E.; Hochman, P.S.; Martin, P. (2001) *Improved pharmacokinetic properties of a polyethylene glycol-modified form of interferon- $\beta 1a$ with preserved in vitro bioactivity*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 297 (3): 1059-1066.
- Perlman, S.; van den Hazel, B.; Christiansen, J.; Gram-Nielsen, S.; Jeppesen, C.B.; Andersen, K.V.; Halkier, T.; Okkels, S.; Schambye, H.T. (2003) *Glycosylation of an N-terminal extension prolongs the half-life and increases the in vivo activity of follicle stimulating hormone*. J. Clin. Endocrinol. Metab. 88 (7): 3227-3235.
- Pestka, S.; Kelder, B.; Familletti, P.C.; Moschera, J.; Crowl, R. (1983) *Molecular weight of the functional unit of human leukocyte, fibroblast and immune interferons*. J. Biol. Chem. 258 (16): 9706-9709.
- Piebler, J., Schreiber, G. (1999) *Mutational and structural analysis of the binding interface between type I interferons and their receptor ifnar2*. J. Mol. Biol. 294: 223-237.
- Piebler, J.; Roisman, L.C.; Schreiber, G. (2000) *New structural and functional aspects of the type I interferon-receptor interaction revealed by comprehensive mutational analysis of the binding interface*. J. Biol. Chem. 275: 40425-40433.
- Puck, T.T.; Cieciura, S.J.; Robinson, A. (1958) *Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects*. J. Exp. Med. 108: 945-959.

- Rachmawati, H.; Poelstra, K.; Beljaars, L. (2004) *The use of cytokines and modified cytokines as therapeutic agents: present state and future perspectives*. En: *Recent research development in immunology*, Vol. 6. Research Signpost, Kerala, India, cap. 2, p.191-214.
- Radhakrishnan, R.; Walter, L.J.; Hruza, A.; Reichert, P.; Trotta, P.P.; Nagabhushan, T.L.; Walter, M.R. (1996) *Zinc mediated dimer of human interferon- α 2b revealed by X-ray crystallography*. Structure 4 (12): 1453-1463.
- Renaud, A.; Lestienne, P.; Hugues, D.L.; Bieth, J.G.; Dimicoli, J.L. (1983) *Mapping the S' subsites of porcine pancreatic and human leucocyte elastases*. J. Biol. Chem. 258 (13): 8312-8316.
- Restelli, V.; Butler, M. (2002) *The effect of cell culture parameters on protein glycosylation*. En: *Cell engineering, Vol. 3: Glycosylation*. (Ed.: Al-Rubeai, M.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Países Bajos, cap. 2, p. 61-92.
- Revoltella, R.P.; Laricchia-Robbio, L.; Moscato, S.; Genua, A.; Liberati, A.M. (1997) *Natural and therapy-induced anti-GM-CSF and anti-G-CSF antibodies in human serum*. Leuk. Lymphoma 26 (1): 29-34.
- Roberts, M.J.; Bentley, M.D.; Harris, J.M. (2002) *Chemistry for peptide and protein PEGylation*. Adv. Drug Deliv. Rev. 54: 459-476.
- Roisman, L.C.; Piehler, J.; Trosset, J.; Scheraga, H.A.; Schreiber, G. (2001) *Structure of the interferon-receptor complex determined by distance constraints from double-mutant cycles and flexible docking*. PNAS 98 (23): 13231-13236.
- Roisman, L.C.; Jaitin, D.A.; Baker, D.P.; Schreiber, G. (2005) *Mutational analysis of the IFNAR1 binding site on IFN- α 2 reveals the architecture of a weak ligand-receptor binding-site*. J. Mol. Biol. 353: 271-281.
- Rossmann, C.; Sharp, N.; Allen, G.; Gewert, D. (1996) *Expression and purification of recombinant, glycosylated human interferon alpha 2b in murine myeloma NS0 cells*. Protein Expr.Purif. 7: 335-342.
- Rubinstein, M.; Rubinstein, S.; Familletti, P.C.; Miller, R.S.; Waldman, A.A.; Pestka, S. (1979) *Human leukocyte interferon: production, purification to homogeneity and initial characterization*. Proc. Natl. Acad. Sci 76 (2): 640-644.
- Rubinstein, S.; Familletti, P.C.; Pestka, S. (1981) *Convenient assay for interferons*. J. Virol. 37 (2): 755-758.
- Rudd, P.M.; Dwek, R.A. (1997) *Glycosylation: heterogeneity and the 3D structure of proteins*. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 32 (1): 1-100.
- Runkel, L.; Pfeffer, L.; Lewerenz, M.; Monneron, D.; Yang, C.H.; Murti, A.; Pellegrini, S.; Goelz, S.; Uzé, G.; Mogensen, K. (1998a) *Differences in activity between α and β type I interferons explored by mutational analysis*. J. Biol. Chem. 273 (14): 8003-8008.
- Runkel, L.; Meier, W.; Pepinsky, R.B.; Karpusas, M.; Whitty, A.; Kimball, K.; Brickelmaier, M.; Muldowney, C.; Jones, W.; Goelz, S.E. (1998b) *Structural and functional differences between glycosylated and non-glycosylated forms of human interferon-beta*. Pharm. Res. 15: 641-649.
- Russel-Harde, D.; Haigeng, P.; Betts, M.; Harkins, R.N.; Perez, H.D.; Croze, E. (1995) *Reconstitution of a high affinity binding site for type I interferons*. J. Biol. Chem. 270 (44): 26033-26036.
- Saiki, R.K. (1990) *Amplification of genomic DNA*. En: *PCR protocols. A guide to methods and applications*. (Eds.: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J.). Academic Press, Inc., San Diego, California, EE.UU., cap. 2, p. 13-20.

- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989a) *Bacterial media, antibiotics and bacterial strains*. En: *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. (Ed.: Nolan, C.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EE.UU., apéndice A.5.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989b) *Plasmid vectors*. En: *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. (Ed.: Nolan, C.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EE.UU., cap. 1, p. 1.1-1.110.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989c) *Spectrophotometric determination of the amount of DNA or RNA*. En: *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. (Ed.: Nolan, C.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EE.UU., apéndice E.5.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989d) *Gel electrophoresis of DNA*. En: *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. (Ed.: Nolan, C.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EE.UU., cap. 6, p. 6.1-6.62.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (1989e) *Analysis and cloning of eukaryotic genomic DNA*. En: *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. (Ed.: Nolan, C.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, EE.UU., cap. 9, p. 9.1-9.62.
- Sareneva, T.; Pirhonn, J.; Cantell, K.; Julkunen, I. (1995) *N-glycosylation of human interferon- γ : glycans at Asn-25 are critical for protease resistance*. *Biochem. J.* 308: 9-14.
- Savage, A. (1997) *Glycosylation: a post-translational modification*. En: *Mammalian cell biotechnology in protein production*. (Eds.: Hauser, H., Wagner, R.). Walter de Gruyter & Co., Berlín, Alemania, cap. 2.2, p. 233-269.
- Selby, C. (1999) *Interference in immunoassay*. *Ann. Clin. Biochem.* 36: 704-721.
- Sen, G.C.; Lengyel, P. (1992) *The interferon system. A bird's eye view of its biochemistry*. *J. Biol. Chem.* 267: 5017-5020.
- Shakin-Eshleman, S.H.; Spitalnik, S.L.; Kasturi, L. (1996) *The amino acid at the X position of an Asn-X-Ser sequon is an important determinant of N-linked core-glycosylation efficiency*. *J. Biol. Chem.* 271 (11): 6363-6366.
- Shargel, L., Wu-Pong, S., Yu, A.B.C. (2005a) *Multicompartmental models: intravenous bolus administration*. En: *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics*. McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York, EE.UU., cap. 4, p. 73-105.
- Shargel, L., Wu-Pong, S., Yu, A.B.C. (2005b) *Pharmacokinetics of oral absorption*. En: *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics*. McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York, EE.UU., cap. 7, p. 161-184.
- Shargel, L., Wu-Pong, S., Yu, A.B.C. (2005c) *Relationship between pharmacokinetics and pharmacodynamics*. En: *Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics*. McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York, EE.UU., cap. 19, p. 575-611.
- Shechter, Y.; Preciado-Patt, L.; Schreiber, G.; Fridkin, M. (2001) *Prolonging the half-life of human interferon- $\alpha 2$ in circulation: design, preparation, and analysis of (2-sulfo-9-fluorenylmethoxycarbonyl) $_7$ -interferon- $\alpha 2$* . *PNAS* 98 (3): 1212-1217.
- Sheffield, W.P. (2001) *Modification of clearance of therapeutic and potentially therapeutic proteins*. *Curr. Drug Targets Cardiovasc. Haematol. Disord.* 1: 1-22.
- Silver, J.; Limjoco, T.; Feinstone, S. (1995) *Site-specific mutagenesis using the polymerase chain reaction*. En: *PCR strategies*. (Eds.: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J.). Academic Press, Inc., San Diego, California, EE.UU., cap. 14, p. 179-188.

- Sinclair, A.M.; Elliott, S. (2005) *Glycoengineering: the effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins*. J. Pharm. Sci. 94 (8): 1626-1635.
- Slaton, J.W.; Perrotte, P.; Inoue, K.; Dinney, C.P.N.; Fidler, I.J. (1999) *Interferon- α -mediated down-regulation of angiogenesis-related genes and therapy of bladder cancer are dependent on optimization of biological dose and schedule*. Clin. Cancer Res. 5: 2726-2734.
- Slutzki, M.; Jaitin, D.A.; Yehezkel, T.B.; Schreiber, G. (2006) *Variations in the unstructured C-terminal tail of interferons contribute to differential receptor binding and biological activity*. J. Mol. Biol. 360: 1019-1030.
- Sofer, G.; Hagel, L. (2001) *Purification design, optimization and scale-up*. En: *Handbook of process chromatography: a guide to optimization, scale-up and validation*. Academic Press, San Diego, California, EE.UU., cap. 5, p. 27-113.
- Solorzano, C.C.; Hwang, R.; Baker, C.H.; Bucana, C.D.; Pisters, P.W.; Evans, D.B.; Killion, J.J.; Fidler, I.J. (2003) *Administration of optimal biological dose and schedule of interferon α combined with gemcitabine induces apoptosis in tumor-associated endothelial cells and reduces growth of human pancreatic carcinoma implanted orthotopically in nude mice*. Clin. Cancer Res. 9: 1858-1867.
- Sotoca Momblona, J.M. (1999) *Cuarenta años de interferones*. Farm. Hosp. 23(4): 205-213.
- Spiro, R.G. (2002) *Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds*. Glycobiology 12 (4): 43R-56R.
- Sugiyama, K.; Ahorn, H.; Maurer-Fogy, I.; Voss, T. (1993) *Expression of human interferon- α 2 in Sf9 cells. Characterization of O-linked glycosylation and protein heterogeneities*. Eur. J. Biochem. 217: 921-927.
- Syed, S.; Kelly, K.E.; Sheffield, W.P. (1997) *Potent antithrombin activity and delayed clearance from the circulation characterize recombinant hirudin genetically fused to albumin*. Blood 89: 3243-3252.
- Sytkowski, A.J.; Dotimas, E.; Kerry, L.; Davis, L.; Feldman, L.; Siekman, S. (1998) *Human erythropoietin dimers with markedly enhanced in vivo activity*. PNAS 95 (3): 1184-1188.
- Takeuchi, M., Takasaki, S., Shimada, M., Kobata, A. (1990) *Role of sugar chains in the in vitro biological activity of human erythropoietin produced in recombinant chinese hamster ovary cells*. J. Biol. Chem. 265 (21), 12127-12130.
- Tarentino, A.L., Gómez, C.M., Plummer, T.H.Jr. (1985) *Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide: N-glycosidase F*. Biochemistry 24 (17), 4665-4671.
- Tedjarati, S., Baker, C.H., Apte, S., Huang, S., Wolf, J.K., Killion, J.J., Fidler, I.J. (2002) *Synergistic therapy of human ovarian carcinoma implanted orthotopically in nude mice by optimal biological dose of pegylated interferon α combined with paclitaxel*. Clin. Cancer Res. 8, 2413-2422.
- Tomayko, M.M., Reynolds, C.P. (1989) *Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice*. Cancer Chemother. Pharmacol. 24 (3), 148-154.
- Trombetta, E.S., Parodi, A.J. (2003) *Quality control and protein folding in the secretory pathway*. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 19, 649-676.
- Tselepis, A.D.; Karabina, S.P.; Stengel, D.; Piédagnel, R.; Chapman, M.J.; Ninio, E. (2001) *N-linked glycosylation of macrophage-derived PAF-AH is a major determinant of enzyme association with plasma HDL*. J. Lipid Res. 42: 1645-1654.

- Turner, P.C., McLennan, A.G., Bates, A.D., White, M.R.H. (2000) *Gene libraries and screening*. En: *Instant notes in molecular biology*. BIOS Scientific Publishers Limited, Liverpool, Reino Unido. Sección I, p. 143-151.
- Van den Steen, P., Rudd, P.M., Dwek, R.A., Opdenakker, G. (1998) *Concepts and principles of O-linked glycosylation*. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 33 (3), 151-208.
- Varki, A. (1993) *Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct*. *Glycobiology* 3 (29), 97-130.
- Vilcek, J.; Sen, G.C. (1996) *Interferons and other cytokines*. En: *Fields Virology, Vol. 2*. (Eds.: Fields, B.N.; Knipe, D.M., Howley, P.M.). Lippincott Williams and Wilkins, Boston, EE.UU., cap. 13, p. 375-399.
- Wadhwa, M., Thorpe, R. (1998) *Cytokine immunoassays: recommendations for standardisation, calibration and validation*. *J. Immunol. Methods* 219, 1-5.
- Wadhwa, M.; Meager, A.; Dilger, P.; Bird, C.; Dolman, C.; Das, R.G.; Thorpe, R. (2000) *Neutralizing antibodies to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-1 alpha and interferon-alpha but not other cytokines in human immunoglobulin preparations*. *Immunology* 99(1):113-123.
- Wagner, R. (1997) *Metabolic control of animal cell culture processes*. En: *Mammalian cell biotechnology in protein production*. (Eds.: Hauser, H., Wagner, R.). Walter de Gruyter, cap. 2.1, p. 193-232.
- Walsh, G. (2003) *Pharmaceutical biotechnology products approved within the European Union*. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 55, 3-10.
- Walsh, G.; Jefferis, R. (2006) *Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins*. *Nat. Biotechnol.* 24 (10): 1241-1252.
- Wang, Y., Youngster, S., Bausch, J., Zhang, R., McNemar, C., Wyss, D.F. (2000). *Identification of the major positional isomer of pegylated interferon alpha-2b*. *Biochemistry* 39, 10634-10640.
- Wang, Y., Youngster, S., Grace, M., Bausch, J., Bordens, R., Wyss, D.F. (2002) *Structural and biological characterization of pegylated recombinant interferon alpha-2b and its therapeutic implications*. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, 547-570.
- Weenen, C., Peña, J.E., Pollak, S.V., Klein, J., Lobel, L., Trousdale, R.K., Palmer, S., Lustbader, E.G., Ogden, R.T., Lustbader, J.W. (2004) *Long-acting follicle-stimulating hormone analogs containing N-linked glycosylation exhibited increased bioactivity compared with O-linked analogs in female rats*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89 (10), 5204-5212.
- Wirth, M. (1997) *Isolation of recombinant cell clones exhibiting high-level expression for the introduced gene*. En: *Mammalian cell biotechnology in protein production*. (Eds.: Hauser, H., Wagner, R.). Walter de Gruyter, cap. 1.5, p. 121-137.
- Wittwer, A.J.; Howard, S.C. (1990) *Glycosylation at Asn-184 inhibits the conversion of single-chain to two-chain tissue-type plasminogen activator by plasmin*. *Biochemistry* 29: 4175-4180.
- Wu, J.C., Liang, Z.Q., Qin, Z.H. (2006) *Quality control system of the endoplasmic reticulum and related diseases*. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 38 (4), 219-226.
- Wurm, F., Bernard, A. (1999) *Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 156-159.

Xing, Z., Wang, J. (2000) *Consideration of cytokines as therapeutic agents or targets*. Curr. Pharm. Des. 6, 599-611.

Zoon, K., Miller, D., Bekisz, J., zur Nedden, D., Enterline, J.C., Nguyen, N.Y., Hu, R. (1992) *Purification and characterization of multiple components of human lymphoblastoid interferon- α* . J. Biol. Chem. 267 (21) 15210-15216.

Zuqueli, R. (2006) Tesis Doctoral: *Desarrollo de una tecnología de producción de interferón β recombinante humano en células eucariotes*. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL, Santa Fe, Argentina.

Parte de los resultados mostrados en esta Tesis fueron publicados en:

Novel long-lasting interferon alpha derivatives designed by glycoengineering.

N. Ceaglio, M. Etcheverrigaray, R. Kratje and M. Oggero

Biochimie, ISSN 0300-9084, (2008) 90(3):437-449.

Parte de los resultados mostrados en esta Tesis fueron presentados en:

XLI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB) - X Congreso de la Asociación Panamericana de Bioquímica y Biología Molecular (PABMB) - XX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Neuroquímica. Diciembre 3-6, 2005. Pinamar. Buenos Aires. Argentina.

“Rational design of an immunochemical assay for quantifying several therapeutic forms of recombinant human interferon- α 2b”.

Ceaglio N., Oggero, M., Kratje R., Etcheverrigaray M.

Libro de Resúmenes (BIOCELL 29, 2005, ISSN 0327-9545), pp. 88.

XLII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Noviembre 12-15, 2006. Rosario. Santa Fe. Argentina.

“Enhancement of IFN- α 2 pharmacokinetic properties through glycoengineering”.

Ceaglio, N., Oggero, M., Etcheverrigaray, M., Kratje, R.

Libro de Resúmenes pp. 59.

Biología Habana 2006 - Aplicaciones médicas de la biotecnología. Noviembre 13-16, 2006.

La Habana. Cuba.

“Novel interferon alpha glycosylated derivatives with extended half-lives”.

Natalia Ceaglio, Marcos Oggero, Marina Etcheverrigaray and Ricardo Kratje.

XLIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Noviembre 17-20, 2007. Mar del Plata. Buenos Aires. Argentina.

“A heavily N-glycosylated Interferon alpha analog with enhanced antitumor activity”.

Ceaglio, N; Etcheverrigaray, M; Kratje, R; Oggero, M.

Libro de Resúmenes (BIOCELL 31, 2007, ISSN 0327-9545), pp. 139.

Cell Culture Engineering XI. Abril 13-18, 2008. Coolum, Sunshine Coast. Queensland. Australia.

“Novel CHO cells-derived IFN alpha analogs with enhanced *in vivo* biological activity”.

Ceaglio, N; Etcheverrigaray, M; Kratje, R; Conrardt, H.; Oggero, M.