

“ANÁLISIS DE LA INMUNOGENICIDAD DE VARIANTES N-GLICOSILADAS DEL INTERFERON ALFA 2B HUMANO RECOMBINANTE”

Leopold, María Jesús

*Laboratorio de Cultivos Celulares (LCC)
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas*

Área: Ciencias Biológicas

Sub-Área: Biotecnología

Grupo: X

Palabras clave: Control de calidad, Bioterapéuticos, Inmunogenicidad.

INTRODUCCIÓN

La terapia con proteínas recombinantes constituye una estrategia muy eficaz para el tratamiento de enfermedades crónicas y deficiencias hereditables. Entre ellas se destacan las citoquinas, hormonas, factores de crecimiento y los anticuerpos monoclonales.

Las proteínas de uso terapéutico son en su mayoría proteínas prácticamente idénticas a las producidas de manera endógena por el organismo. Desarrollan un conjunto de funciones específicas y complejas que no pueden ser realizadas por compuestos químicos simples. Al presentar una acción altamente específica, el riesgo de que interfieran con los procesos biológicos normales y causen efectos adversos es reducido. No obstante, han sido reportados numerosos casos de respuestas inmunológicas desarrolladas como consecuencia de la administración de dichas drogas, que pueden producir diversos efectos de variada complejidad y gravedad según las circunstancias (De Groot y col., 2007). Por este motivo las agencias encargadas de regular la calidad y seguridad de estos productos, exigen el análisis de la inmunogenicidad entre sus requerimientos. Sin embargo, son escasos los centros de investigación en el mundo que se dedican a la determinación de esta característica y al desarrollo de nuevas drogas con inmunogenicidad reducida. Más aun, nuestro país carece de laboratorios especializados en la materia.

El Interferón alfa 2b (IFN- α 2b) es una citoquina empleada para el tratamiento de la Hepatitis B y C crónicas y algunos sub-tipos de cáncer. Sin embargo, su uso está condicionado por su corta vida media en circulación y la consecuente necesidad de múltiples dosis durante un periodo prolongado. Esta terapia ha generado en numerosos casos un quiebre de la tolerancia inmunológica a antígenos propios, conduciendo así a la producción de anticuerpos anti-IFN- α y a una reducción de la eficacia del tratamiento (Nolte y col., 1996; Tovey y col., 2010).

Para evitar esto se han empleado diversas estrategias. Entre ellas, la glicoingeniería, que ha permitido mejorar la estabilidad de las proteínas, su solubilidad, su actividad in vivo, su farmacocinética, su vida media en suero, la velocidad de depuración y su inmunogenicidad (Ceaglio y col., 2008).

Por lo antes expuesto, en nuestro laboratorio se desarrollaron variantes hiperglicosiladas del IFN- α 2b recombinante humano provistas de sitios adicionales de N-glicosilación, designadas de la siguiente manera: IFN-2NM47/95, IFN-3NM47 “Análisis de la Inmunogenicidad de variantes N-glicosiladas de Interferón alfa 2b humano recombinante (rhIFN- α 2b)”

Director: Dr. Eduardo Mufarrege

Co-Director: Dra. Marina Etcheverrigaray

Proyecto: PICT-2014-2343

(ambas con 4 sitios adicionales de N-glicosilación), IFN-3NM47/95 (con 5 sitios) e IFN-3NM47 Nter (con 6 sitios). Dichas modificaciones otorgaron mejoras notables a la proteína en comparación con la molécula original, como ser una mayor vida media en suero y una mejor relación entre las actividades anti-viral y anti-proliferativa. Esto permitiría reducir la dosis y frecuencia de administración para alcanzar la ventana terapéutica. Sin embargo, ningún estudio se ha llevado a cabo con el fin de analizar la inmunogenicidad de estas variantes.

OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo se centra en el análisis de la inmunogenicidad de las versiones hiperglicosiladas del rhIF- α 2b, mediante un protocolo *ex vivo* con células mononucleares de sangre periférica humana.

METODOLOGÍA

Producción y purificación de las proteínas de interés:

Los clones celulares CHO-K1, productores de las versiones hiperglicosiladas de IFN, se cultivaron en frascos triples de 500 cm². Los sobrenadantes de cultivo se cosecharon cada 48 hs y se conservaron a -20°C hasta su procesamiento. En cada caso se colectaron diez cosechas y se acondicionaron de acuerdo a la solución de equilibrado de la columna. La purificación se llevó a cabo a partir de un único paso de cromatografía de inmunoafinidad empleando una resina de bromuro de cianógeno acoplada a un anticuerpo monoclonal (CA5E6). Las eluciones se colectaron y analizaron mediante PAGE-SDS y espectrofotometría. Una vez evaluadas, se diafiltraron en columnas Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Units (Milipore) con el propósito de concentrarlas y de realizar un cambio de *buffer* a PBS.

Análisis de pureza y concentración

La concentración y pureza de las proteínas se evaluaron mediante PAGE-SDS y HPLC-C4. La cromatografía se realizó a temperatura ambiente, empleando un flujo de 1 mL/min. Se empleó un columna C4 Júpiter™ de 4,15 mL, rellena con partículas de 5 μ m de diámetro y de un tamaño de poro de 300 Å. El equilibrado se realizó con una solución acuosa de ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1% (V/V) en acetonitrilo (ACN) al 20% (V/V). Se inyectaron 100 μ L de muestra y se detectaron las proteínas a una λ =210 nm.

Análisis de la inmunogenicidad de las proteínas de interés

En general, el análisis de la inmunogenicidad de proteínas se realiza empleando células mononucleares (CMN) de sangre periférica humana debido a que brindan una visión más representativa de lo que ocurriría al administrar el producto en pacientes. De esta manera, la proteína se incuba en un entorno que dispone tanto de células presentadoras de antígenos como de linfocitos T y B, los cuales, a su vez, son capaces de desarrollar una respuesta inmune detectable por diversos métodos. La intensidad de dicha respuesta se determina mediante la cuantificación de interferón gamma (IFN- γ) e interleucina 4 (IL-4), que caracterizan los perfiles Th1 y Th2, respectivamente. La técnica que se utiliza para determinar los niveles de estas citoquinas en sobrenadante de cultivo es el ensayo inmunoenzimático (ELISA) sándwich. Sin embargo, IFN- α posee una fuerte actividad antiproliferativa que inhibe el desarrollo de los clones de linfocitos T potencialmente reactivos, especialmente LT vírgenes. Por

este motivo no se puede llevar a cabo el análisis de la inmunogenicidad de las variantes hiperglicosiladas del IFN mediante la incubación directa de éstas con CMN de sangre periférica humana. Debido a esto, el protocolo abordado en el presente trabajo consistió en la purificación inicial de monocitos que fueron luego diferenciados a células dendríticas inmaduras por medio de la incubación con GM-CSF e IL-4. Luego, estas células fueron incubadas con cada variante del IFN y maduras con TNF-alfa. Finalmente, las células dendríticas maduras se emplearon en ensayos de linfoproliferación de LT autólogos. Los sobrenadantes de cultivo se colectaron y evaluaron en cuanto a la producción de IFN- γ e IL-4 (Wullner y col., 2010).

RESULTADOS

La determinación de la concentración de IFN en los sobrenadantes de cultivo se realizó a través de un ELISA sándwich. El cálculo se efectuó mediante el ensayo de rectas paralelas. Los resultados de cada variante se muestran a continuación (tabla 1).

Variante IFN	IFN 2NM47/95	IFN 3NM47	IFN 3NM47/95	IFN 3NM47 Nter
Concentración Promedio (ng/mL)	270,2	270,1	794,5	388,9

Tabla 1: Concentración promedio de las variantes de IFN por mL de sobrenadante total.

Luego, se realizó la purificación de las variantes presentes en los sobrenadantes de cultivo por cromatografía de inmunoafinidad. Finalizado este proceso, se analizó la eficiencia de la purificación mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras y con tinción posterior con azul brillante de *Coomasie* (figuras 1 y 2).

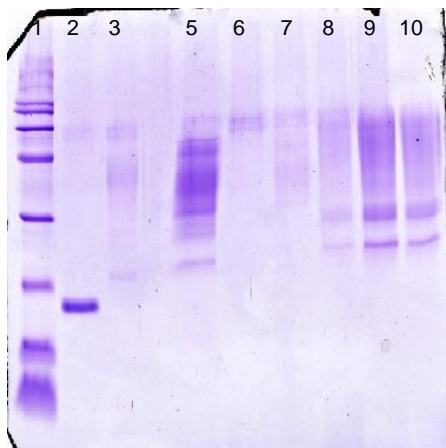


Figura 1: Evaluación de la presencia del IFN- α en las eluciones obtenidas a partir de la cromatografía. Calles: 1- Marcador de tamaño molecular; 2-IFN no glicosilado; 3-IFN-4N; 5, 6 y 7- Eluciones 3, 4 y 5 de IFN 2NM47/95; 8, 9 y 10- Eluciones 3, 4 y 5 de IFN 3NM47 Nter.

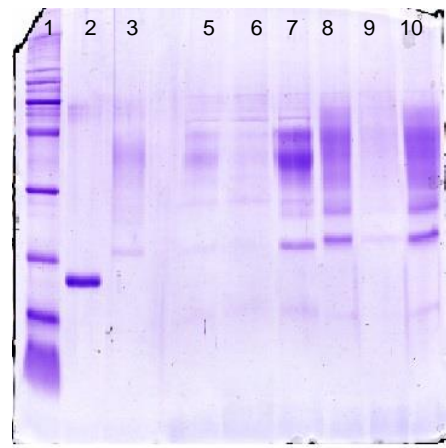


Figura 2: Evaluación de la presencia del IFN- α en las eluciones obtenidas a partir de la cromatografía de inmunoafinidad. Calles: 1- Marcador de tamaño molecular; 2-IFN no glicosilado; 3-IFN-4N; 5, 6 y 7- Eluciones 3, 4 y 5 de IFN 3NM47; 8, 9 y 10- Eluciones 4, 3 y 5 de IFN 3NM47/95.

De la cromatografía de cada variante, se tomaron fracciones de *flowthrough* y de los dos lavados realizados. Estas 2 fracciones, una fracción de cosecha y los pools 1

(eluciones 3, 4, 5) y 2 (eluciones 6, 7, 8) fueron cuantificados por ELISA sándwich. Se muestran los valores obtenidos para la variante IFN 2NM47/95 en la tabla 2.

	Cosecha	Flowthrough	Lavado 1	Lavado 2	Pool 1	Pool 2
Concentración de IFN (ng/mL)	356,70	0,20	5,82	1,83	3177,33	2032,24

Tabla 2: Concentración de IFN 2NM47/95 en las diferentes fracciones obtenidas.

Se concentró el pool 1 de cada variante mediante un proceso de diálisis, que permitió además realizar el cambio de buffer a PBS.

El análisis cualitativo de la pureza de las variantes de interferón diafiltradas se realizó mediante SDS-PAGE (figura 3) y HPLC-C4.

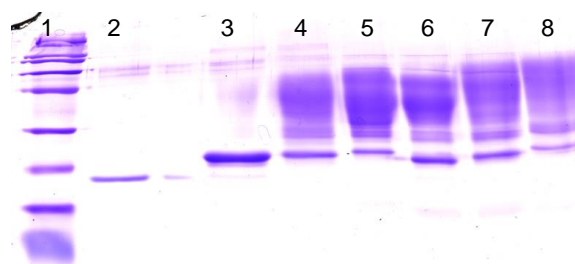


Figura 3: Evaluación de la pureza de las variantes de IFN. Calles: 1- Marcador de masa molecular; 2-IFN no glicosilado; 3- IFN-WT; 5- IFN-4N; 6- IFN 2NM47/95; 7- IFN 3NM47; 8- IFN 3NM47/95; 9- INF 3NM47 Nter.

En la fig.3 es posible apreciar el retardo en el perfil migratorio de las variantes N-glicosiladas de IFN en comparación con el IFN no glicosilado (calle 2) y el IFN WT (calle 3) que presenta una única O-glicosilación.

Se estimó la concentración de las variantes de IFN por absorbancia a λ de 280 nm (tabla 3).

Variante IFN	IFN 2NM47/95	IFN 3NM47	IFN 3NM47/95	IFN 3NM47 Nter
Concentración (mg/mL)	2,57	4,60	3,43	4,48

Tabla 3: Concentración de las variantes de IFN estimadas a partir de la lectura de absorbancia a una λ de 280 nm.

Ensayos en curso

Las proteínas producidas y purificadas presentan la calidad y cantidad apropiadas para llevar a cabo el análisis de su inmunogenicidad. Dicho estudio se está llevando a cabo a través del protocolo antes descrito.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Ceaglio N., Etcheverrigaray M., Kratje R., Oggero M., 2008. Novel long-lasting interferon alpha derivatives designed by glycoengineering. *Biochimie*, 90, 437-449.

De Groot A., Scott D., 2007. Immunogenicity of protein therapeutics. *Trends in Immunology*, 28, 482-490.

Nolte K., Günter G., Von Wussow P., 1996. Epitopes recognized by neutralizing therapy-induced human anti-interferon- α antibodies are localized within the N-terminal functional domain of recombinant interferon- α 2. *Eur. J. Immunol*, 26, 2155-2159.

Tovey M., Lallemand C., 2010. Safety, Tolerability, and Immunogenicity of Interferons. *Pharmaceuticals*, 3, 1162-1186.

Wullner D., Zhou L., Bramhall E., Kuck A., Goletz T., Swanson S., ChirmulenN., Jawa V., 2010. Considerations for optimization and validation of an *in vitro* PBMC derived T cell assay for immunogenicity prediction of biotherapeutics. *Clinical Immunology* 137, 5-14.