



Artículo de  
investigación

Derecho de copia@ Juan Pedro Lapuente,  
Alberto Anel

# Investigación combinada *in silico* y experimental para probar la posible inmunogenicidad de un nuevo fármaco biológico complejo (PRS CK STORM)

Juan Pedro Lapuente<sup>1\*</sup>, Gonzalo Gómez<sup>1</sup>, Joaquín Marco Brualla<sup>2</sup>, Pablo Fernández<sup>1</sup>, Paula Desportes<sup>3</sup>, Jara Sanz<sup>3</sup>, Mario García Gil<sup>4</sup>, Fernando Bermejo<sup>5,6</sup>, Juan V San Martín<sup>7</sup>, Alicia Algaba<sup>8</sup>, Juan Carlos De Gregorio<sup>1</sup>, Daniel Lapuente<sup>1</sup>, Almudena De Gregorio<sup>1</sup>, Belén Lapuente<sup>1</sup>, Sergio Gómez<sup>1</sup>, María de la Viñas Andrés<sup>1</sup> y Alberto Anel<sup>2\*</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Investigación de Biología Molecular y Celular R4T, Hospital de Fuenlabrada,

España <sup>2</sup>Grupo de Inmunidad, Cáncer y Células Madre, Facultad de Ciencias, Universidad de

Zaragoza, España <sup>3</sup>Instalación de PMP, Peaches Biotech, España

<sup>4</sup>Servicio de Farmacia, Hospital de Fuenlabrada, España

<sup>5</sup>Servicio de Digestivo, Hospital de Fuenlabrada, España

<sup>6</sup>Departamento de Medicina, Universidad Rey Juan Carlos, Fuenlabrada, España

<sup>7</sup>Servicio de medicina interna, Hospital de Fuenlabrada, España

<sup>8</sup>Departamento de Ensayos Clínicos, Hospital de Fuenlabrada, España

**\*Autor correspondiente:** Juan Pedro Lapuente, Laboratorios de Investigación de Biología Molecular y Celular R4T, Hospital de Fuenlabrada, Madrid, 28942, España.

Alberto Anel, Grupo Inmunidad, Cáncer y Células Madre, Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza, 50009, España.

**Para citar este artículo:** Juan Pedro Lapuente, Gonzalo Gómez, Joaquín Marco Brualla, Pablo Fernández, Alberto Anel, et al., Investigación combinada *in silico* y experimental para probar la posible inmunogenicidad de un nuevo fármaco biológico complejo (PRS CK STORM). *Am J Biomed Sci & Res.* 2022 - 16(2). *AJBSR.MS.ID.002212*. DOI: [10.34297/AJBSR.2022.16.002212](https://doi.org/10.34297/AJBSR.2022.16.002212)

**Recibido:** 11 de abril de 2022; **Publicado:** 11 de mayo de 2022

## Resumen

Los tratamientos con medicamentos biológicos suelen tener una eficacia relativa que disminuye principalmente por dos razones. En primer lugar, los fármacos basados en el uso de altas dosis de proteínas, especialmente los fabricados artificial o semiartificialmente por biotecnología, tienden a producir reacciones de inmunogenicidad y a generar anticuerpos antifármaco (ADA) en un cierto porcentaje de los pacientes a los que se aplican. En segundo lugar, un enfoque terapéutico basado en el uso único de un anticuerpo monoclonal no cubre los posibles mecanismos de retroalimentación positiva o negativa en las vías metabólicas asociadas en paralelo. Nuestro grupo de investigación ha desarrollado una nueva plataforma biotecnológica que permite la producción de fármacos biológicos complejos para uso alogénico, basada en la generación de cocultivos de macrófagos con células estromales o células primarias, con contacto indirecto. En este artículo se describen los ensayos *in silico*, *in vitro* e *in vivo* realizados con el fármaco PRS CK STORM, un medio condicionado de macrófagos M2 producido por cocultivo con contacto indirecto con MSCs procedentes de grasa, cuyos resultados demuestran la ausencia de inmunogenicidad del producto aplicado a las dosis ensayadas, demostrando la posible seguridad del fármaco.

**Palabras clave:** Cocultivo; Macrófagos M2; Células madre mesenquimales (MSC); PRS CK STORM; Inmunogenicidad; Anticuerpos antidroga (ADAs)

## Introducción

La inmunogenicidad se define como la capacidad de una sustancia para inducir una respuesta inmunitaria humoral o celular específica y es el resultado de las diferencias en la estructura tridimensional de cualquier molécula exógena frente a sus propias proteínas [1]. Los anticuerpos o inmunoglobulinas son glicoproteínas secretadas por las células plasmáticas o linfocitos B, que forman parte del sistema inmunitario adaptativo. Existen varios tipos de inmunoglobulinas según su estructura molecular y sus funciones, como la IgM, la IgG, la IgA, la IgE y la IgD, pero son los anticuerpos IgG los responsables de la mayor parte de la protección inmunitaria contra los fármacos exógenos.

Todos los fármacos biológicos, incluso los de origen puramente humano, pueden ser reconocidos por el sistema inmunitario del paciente en tratamiento como estructuras extrañas y convertirse en antígenos, lo que puede dar lugar a la formación de anticuerpos contra el fármaco, denominados ADA (Anti-Drug Antibody) [2]. Este tipo de respuesta inmune puede, en el mejor de los casos, conducir a una falta de eficacia terapéutica del fármaco biológico en un determinado porcentaje de pacientes, debido a una reducción de la exposición terapéutica, y en el peor de los casos, incluso a una reacción de anafilaxia [3,4]. Para darse cuenta de la importancia de la potencial inmunogenicidad de los fármacos biológicos, basta con observar las normas impuestas al respecto tanto por la Food and Drug Administration (FDA) [5] como por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) [6].

La respuesta inmunitaria contra los fármacos biológicos suele ser dependiente de los linfocitos T, pero también existen vías independientes de los T [7,8]. En cualquier caso, una vez introducido el fármaco biológico en el organismo del paciente, la respuesta inmune se expresará inicialmente a través de un aumento de las inmunoglobulinas de baja afinidad de la respuesta aguda, es decir, a través de un aumento inicial de IgM. Esta respuesta inicial a través de un aumento de IgM dará paso, en pocos días, a una respuesta a través de un aumento de IgG. Esta inmunoglobulina tiene 4 subtipos, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Esta última, junto con la IgG2a, es la que se asocia con mayor frecuencia a la pérdida de eficacia de un fármaco biológico debido a la pérdida de exposición al mismo, y sus niveles en sangre están directamente relacionados con la formación de ADA frente a fármacos biológicos [9-12]. De hecho, esta reacción inmunológica de generación de ADA, basada en el aumento de los niveles de IgG4 en la sangre del paciente tratado, se ha visto con frecuencia en los tratamientos basados en el uso de anticuerpos monoclonales contra el TNF- $\alpha$  [2]. Días después de que se haya generado la respuesta inmune contra el fármaco biológico a través de una respuesta de inmunoglobulinas IgM y/o IgG (principalmente IgG4), si el estímulo se mantiene mediante la administración prolongada del fármaco, los linfocitos B madurarán y producirán células plasmáticas que generarán ADAs contra el fármaco

biológico. Es importante destacar que los fármacos basados en proteínas pueden conducir a una maduración acelerada de estos linfocitos B y, por tanto, a una producción más temprana y mayor de ADAs contra el fármaco.

Nuestro fármaco PRS CK STORM es un medio condicionado de macrófagos M2 producido por co-cultivo de contacto indirecto de macrófagos M2 de monocitos de donantes con Células Madre Mesenquimales (MSCs) de grasa también de diferentes donantes. El uso previsto de PRS CK STORM es el tratamiento de la tormenta de citoquinas asociada a procesos infecciosos de moderados a graves, incluida la asociada a COVID-19, por administración intravenosa. Por lo tanto, se considera un medicamento biológico alogénico compuesto principalmente por proteínas humanas, principalmente citocinas, quimioquinas y factores de crecimiento. Al tratarse de proteínas humanas de bajo peso molecular, y además utilizarse a dosis bajas (se aplican dosis del orden de 106 picogramos), sería aplicable en este caso el principio de autotolerancia; este principio sugiere que las proteínas humanas no deberían provocar una respuesta inmunitaria. Pero puede que no sea así, ya que existen antecedentes de reacciones inmunitarias a través de los linfocitos T a las proteínas autólogas utilizadas en el tratamiento de la diabetes [13,14] y la esclerosis múltiple [15,16]. Por lo tanto, la inmunogenicidad potencial del producto debe predecirse mediante estudios *in silico* combinados con estudios *in vitro*, y luego con ensayos *in vivo*.

Actualmente, la norma de oro para la predicción *in silico* de la inmunogenicidad es el uso de algoritmos de aprendizaje automático. Los métodos de aprendizaje automático convierten los datos de entrada recogidos en información útil al ser capaces de predecir respuestas futuras para variables futuras, y al cruzar constantemente los datos recién obtenidos, explorando las relaciones entre el proceso y las variables de entrada y salida. Los enfoques de aprendizaje automático utilizados en el análisis *in silico* se dividen en dos categorías principales: aprendizaje supervisado y aprendizaje no supervisado. En el aprendizaje supervisado, necesitamos "datos de entrenamiento", que son pares de variables de entrada y salida, a partir de los cuales el sistema "aprende". Algunos de los algoritmos más comunes utilizados en el aprendizaje supervisado son la regresión lineal, los mínimos cuadrados parciales, las redes neuronales, las máquinas de vectores de apoyo y los bosques aleatorios.

En el caso concreto de la PRS CK STORM, se optó por aplicar un sencillo sistema de algoritmos de alineación de secuencias [17], primero de las secuencias codificantes completas de las citoquinas seleccionadas, y luego sólo de los exones, que comparan dos o más secuencias tratando de encontrar similitudes entre ellas, tanto estructurales como funcionales y evolutivas, para predecir la posible inmunogenicidad, dado que el proceso de estudios *in vivo* previsto incluía tratar dos especies animales diferentes (rata y cerdo) con un medio condicionado de origen humano.

Dado que este sistema es propenso a errores [18], se propuso un ensayo *in vitro* para estudiar la actividad metabólica de los macrófagos humanos, de rata y de cerdo del tipo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol).

Una vez verificada la posible ausencia de inmunogenicidad en las pruebas *in silico* e *in vitro*, se administró el fármaco PRS CK STORM a dosis repetidas durante 14 días, para verificar definitivamente la existencia o no de inmunogenicidad del fármaco en cualquiera de las dos especies.

## Materiales y métodos

### Investigación sobre la alineación de secuencias múltiples (MSA) *in silico*

La base de datos Gene, un recurso del Centro Nacional de

Biotechnology Information (NCBI) que centraliza la información relacionada con los genes en registros individuales, se utilizó como fuente para extraer los genes completos de las ocho citocinas de las 3 especies (humano, cerdo y rata). Los genomas de las siguientes citoquinas cuantificadas principalmente en 7 lotes diferentes de PRS CK STORM producidos (IL-1 $\beta$ , TIMP-1, IL-1Ra, MMP-3, IL-6, HGF, MCP-1, MMP-1) en 3 diferentes especies (humano, rata y cerdo) fueron seleccionadas. La Tabla 1 enumera tanto los genes estudiados identificados en la base de datos de genes del NCBI como los alineamientos estudiados.

**Tabla 1:** Citoquinas, especies, IDs de genes y alineaciones de exones estudiados.

Citoquina	Especie	Identificación de genes	Alineación
IL-1 $\beta$	Humano	3553	88...897
	Rata	24494	57...863
	Cerdo	397122	67...870
TIMP1	Humano	7076	48...671
	Rata	116510	36...689
	Cerdo	396862	13...636
IL1Ra	Humano	3557	268...699
	Rata	60582	5...541
	Cerdo	397499	30...563
MMP3	Humano	4314	64...1497
	Rata	171045	58...1485
	Cerdo	396769	57...1490
IL6	Humano	3569	64...633
	Rata	24498	65...700
	Cerdo	399500	64...702
HGF	Humano	3082	77...2263
	Rata	24446	143...2329
	Cerdo	1.01E+08	13...2442
MCP1	Humano	6347	66...365
	Rata	24770	76...522
	Cerdo	397422	53...352
MMP1	Humano	4312	115...1326
	Rata	300339	43...1437
	Cerdo	397320	192...1601

Posteriormente, se aplicó la técnica *in silico* de alineación múltiple de las secuencias de los genes completos de las citocinas siguiendo un método de alineación progresiva (MSA) con el software Clustal W [19] (<https://www.uniprot.org>) para comparar la alineación de las bases de los tres genes completos que codifican cada citocina específica en cada especie. El algoritmo de alineación múltiple aplicado consta de tres pasos principales. En primer lugar, todos los pares de secuencias se alinean por separado para calcular una matriz de distancia

dando la divergencia de cada par de secuencias, en segundo lugar se calcula un árbol guía a partir de la matriz de secuencias y, finalmente, se alinean progresivamente según el orden de ramificación en el árbol guía [19]. A continuación, se aplicó la técnica de alineación de secuencias múltiples *in silico* siguiendo un método de alineación progresiva (MSA) con el software Clustal Omega ([https://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web\\_clustalo/toolform.ebi](https://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web_clustalo/toolform.ebi)) para comparar la alineación de sólo las bases de los exones de los tres genes que codifican cada

citoquina específica en cada especie [20]. Posteriormente, se analizaron los patrones de conservación funcional de las anotaciones de Procesos Biológicos GO basados en técnicas computacionales según las anotaciones electrónicas frente al porcentaje de similitud de secuencia [20].

### Producción de PRS CK STORM

Para el presente estudio se utilizó la producción de PRS CK STORM, cuyo proceso completo de producción se describe completa y detalladamente en Lapuente et al. [21].

### Ensayo MTT (bromuro de 3-(3,4 -dimetiltiazol-2-tiazolil)-2,5- difeniltetrazolio)

Para comprobar la posible reacción de inmunogenicidad *in vitro*, se realizó un ensayo de tipo MTT en células THP-1 transformadas en macrófagos adaptando el método de Chen et al. [22]. Las células THP-1 diferenciadas se lavaron tres veces con 0,2mL de medio THP-1 templado sin PMA y se dejaron reposar durante 30min antes del estímulo de LPS. Tras el cambio de medio celular, las células se trataron con 10ng/mL de LPS (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA) en medio RPMI 1640 y se trataron con 100µL de PRS CK STORM o con el control definido anteriormente añadiendo medio THP-1 templado para obtener 200µL de cultivo celular por pocillo. Tres pocillos se sembraron con células THP- 1m solamente, tres se sembraron con células THP- 1m estimuladas con LPS a una concentración de 10ng/mL, tres se sembraron con células THP- 1m estimuladas con LPS a una concentración de 10ng/mL y PRS CK STORM a una dosis baja, tres se sembraron con células THP- 1m estimuladas con LPS a una concentración de 10ng/mL y PRS CK STORM a una dosis media, tres se sembraron con células THP-1m estimuladas con LPS a una concentración de 10ng/mL y PRS CK STORM a una dosis alta, y finalmente, como controles, tres se sembraron con células THP-1m estimuladas con LPS a una concentración de 10ng/mL e hidrocortisona a 10µg/mL (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA). Las diferentes concentraciones crecientes de

El PRS CK STORM se calculó en función del contenido de TIMP-1 en el medio condicionado (bajo con 594,86pg de TIMP-1 total, medio con 1189,72pg de TIMP-1 y alto con 5948,6pg de TIMP-1). Tras la incubación de todos los cultivos durante 96 horas, se añaden 10µl/pocillo de una solución acuosa (5mg/ml) de azul de tetrazolio (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA). La solución de MTT/azul de tetrazolio se incubó durante 4 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, después de la incubación las placas se centrifugan a 600g, durante 7 minutos para precipitar las células y los cristales de formazán, y después de retirar el medio los cristales de formazán se solubilizan añadiendo 200µL/pocillo de DMSO. Las placas se incuban a 37°C durante 10 minutos y se agitan a 250rpm utilizando un agitador de placas (JP Selecta, Abrera, Cataluña, España). Los resultados se obtienen midiendo la absorbancia de cada pocillo a 570 nm en un lector de placas iMark (BioRad, Hercules, California, USA).

### Prueba de inmunogenicidad *in vivo* en condiciones BPL (buenas prácticas de laboratorio)

Se utilizaron dos especies animales para el estudio de inmunogenicidad *in vivo* de la PRS CK STORM. En primer lugar, se utilizaron ratas *Rattus Norvegicus* de 8 semanas de edad de la cepa Sprague Dawley del proveedor ENVIGO (Indianápolis, IN, EE.UU.) y alojadas y tratadas en las instalaciones de Vivotecnia. En segundo lugar, se utilizaron minicerdos de 5 meses de la cepa Göttingen del proveedor Ellegaard (Dalmoose, Dinamarca) alojados y tratados en Vivotecnia en condiciones BPL (véase el apéndice 1 para la certificación BPL del laboratorio de Vivotecnia).

Inicialmente se utilizaron 140 ratas, 70 hembras y 70 machos, y 40 minipigs, 20 hembras y 20 machos, que fueron distribuidos aleatoriamente en 4 grupos en dos asignaciones (principal y de recuperación). Todos los animales fueron dosificados por vía intravenosa con PRS CK STORM o tratamiento con vehículo (solución salina fisiológica estéril) una vez al día durante 14 días y todos los animales del grupo de recuperación tuvieron un período de 14 días sin tratamiento. Los detalles sobre la dosificación y la administración de PRS CK STORM en ambas especies se indican en la Tabla 1A y 1B.

**Tabla 1A y 1B:** Características de la administración de PRS CK STORM a las dos especies.

Procedimiento de prueba	PRS-CK STORM en ratas
Nivel de dosis (pg/kg)	Grupo B: 26.076pg/kg/día
	Grupo C: 52.151pg/kg/día
	Grupo D: 260.756pg/kg/día
Volumen de la dosis (mL/animal)	Volumen de dosis fijo de 15ml/animal
Vía de administración	Inyección intravenosa (bolo) en la vena marginal de la oreja y/o en la vena lateral del tarso de los miembros posteriores, mediante un catéter con aguja de 22-24G y una jeringa desechable, durante un periodo de aproximadamente 60-90 segundos. El día anterior al inicio del tratamiento (y si los animales pierden el catéter), se insertará el catéter temporal bajo anestesia de isoflurano.
Régimen de dosificación	Una vez al día
Duración de la dosis	14 días

Am J Biomed Sci & Res	Procedimiento de prueba	Solución salina fisiológica estéril en ratas
	Volumen de la dosis (mL/animal)	Copia © Juan Pedro Lapuente, Alberto Anel Volumen de dosis fija de 15ml/animal de solución salina

Vía de administración	Inyección intravenosa (bolo) en la vena marginal de la oreja y/o en la vena lateral del tarso de los miembros posteriores, mediante un catéter con aguja de 22-24G y una jeringa desechable, durante un periodo de aproximadamente 60-90 segundos. El día anterior al inicio del tratamiento (y si los animales pierden el catéter), se insertará el catéter temporal bajo anestesia de isoflurano.
Régimen de dosificación	Una vez al día
Duración de la dosis	14 días

Procedimiento de prueba	PRS-CK STORM en minipigs
Nivel de dosis (pg/kg):	Grupo B: 118.971pg/kg
	Grupo C: 237,939pg/kg
	Grupo D: 1.189.700pg/kg
Volumen de la dosis (mL/animal):	Volumen de dosis fija de 1,5ml/animal
Vía de administración:	Inyección intravenosa (bolo) en la vena lateral de la cola utilizando una aguja de 25-29G y una jeringa desechable, durante un período de aproximadamente 30-60 segundos.
Régimen de dosificación:	Una vez al día
Duración de la dosis:	14 días
Procedimiento de prueba	Solución salina fisiológica estéril en minicerdos
Volumen de la dosis (mL/animal):	1,5 ml/animal de solución salina
Vía de administración:	Inyección intravenosa (bolo lento) en la vena lateral de la cola utilizando una aguja de 25-29G y un jeringa.
Régimen de dosificación:	Una vez al día
Duración de la dosis:	14 días

En el caso de las ratas, cada grupo principal comprendía 20 ratas macho y 20 ratas hembra. Los grupos A y D incluían 4 animales adicionales por sexo (animales de recuperación) que se mantuvieron durante 2 semanas adicionales de recuperación a los 14 días de tratamiento. Los animales tratados con solución salina fisiológica estéril fueron asignados al Grupo A y los animales tratados con PRS CK STORM en tres dosis diferentes fueron asignados a los Grupos B, C y D. En cuanto a los minipigs, cada grupo principal estaba formado por 4 minipigs machos y 1 hembra. Los grupos A y D incluían 2 animales adicionales

por sexo (animales de recuperación), que fueron retenidos para una recuperación adicional de 2 semanas a los 14 días de tratamiento. Al igual que en las ratas, los animales tratados con solución salina fisiológica estéril se asignaron al Grupo A y los animales tratados con PRS CK STORM a tres dosis diferentes se asignaron a los Grupos B, C y D. La Tabla 2 muestra la asignación de animales en cada grupo. Para el análisis de inmunogenicidad, se tomaron muestras de sangre como se indica en la Tabla 3.

**Cuadro 2:** Identificación de animales principales y de recuperación.

Grupo	Tratamiento	Dosis (pg/kg/día)	Principal				Recuperación			
			Números de ratas		Números de minipigs		Números de ratas		Números de minipigs	
			Hombre	Mujer	Hombre	Mujer	Hombre	Mujer	Hombre	Mujer
A	Vehículo	0	1-10	41-50	1-4	17-20	81-85	91-95	33-34	37-38
B	Elemento de prueba	26.076(ratas)	11-20	51-60	5-8	21-24				
		118.971(cerdos)								
C	Elemento de prueba	52151(ratas)	21-30	61-70	9-12	25-28				
		237939(cerdos)								
D	Elemento de prueba	260756(ratas)	31-40	71-80	13-16	29-32	86-90	96-100	35-36	39-40
		1189700(cerdos)								

**Tabla 3:** Características de la toma de muestras de sangre.

<b>RATAS</b>	
Programa de muestreo	Una vez antes del tratamiento y el día 15: todos los animales principales y de recuperación. Día 29: todos los animales de recuperación.
Animales para desangrar	Todos los animales en cada punto de tiempo.
Volumen de la muestra de sangre	0,5mL
Método de recogida	En cada ocasión de muestreo, las muestras de sangre se obtendrán por vena sublingual bajo anestesia con isoflurano
Tubos de muestreo	2 tubos de 1mL con K3-EDTA
Alícuotas	2 Alícuotas de aproximadamente 500µL
<b>MINIPIGS</b>	
Programa de muestreo	Una vez antes del tratamiento y el día 15: todos los animales principales y de recuperación. Día 29: todos los animales de recuperación.
Animales para desangrar	Todos los animales en cada punto de tiempo.
Volumen de la muestra de sangre	2mL
Método de recogida	En cada ocasión de muestreo, las muestras de sangre se obtendrán a través de la vena yugular.
Tubos de muestreo	2 tubos de 1mL con K3-EDTA
Alícuotas	2 Alícuotas de aproximadamente 500µL

Se tomaron muestras de sangre de ambas especies, para las ratas en una Microvette® de 500µL con citrato y para los minipigs en un tubo de 2mL con K3-EDTA. Inmediatamente se centrifugó la sangre sin cubrir a temperatura ambiente ( $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) a 1500G durante 10 minutos para obtener plasma. Las muestras de plasma se recogieron en un tubo separado y se centrifugaron bajo refrigeración una segunda vez a 600G durante 5 minutos. El plasma se recogió cuidadosa y completamente excluyendo el pellet del fondo del tubo. Dos alícuotas de plasma aislado (200µL para ratas y 500µL para minipigs) se almacenaron congeladas a  $-80^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Para los análisis de inmunogenicidad, todas las muestras se descongelaron en hielo y, tras extraer la cantidad necesaria para realizar las determinaciones, las muestras se almacenaron inmediatamente en el congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  una vez utilizadas. En el caso de las ratas, el método elegido para la determinación de la variación de inmunoglobulinas fue la cuantificación Multiplex con el kit ProcartaPlex Rat Antibody Isotyping Panel 6 plex (Ref: EPX060-30123-901) de ThermoFisher Scientific (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante.

Las inmunoglobulinas cuantificadas fueron IgA, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c e IgM. Las muestras se analizaron por duplicado en un instrumento Luminex 200 con el software Exponent 4.3 (ambos de Luminex). En total, se utilizaron 7 placas de 96 pocillos, con 40 muestras duplicadas por placa junto con los 16 estándares. En el caso de los minipigs, al no disponer de un kit similar, se optó por una técnica ELISA sencilla, también con placas de 96 pocillos, con 40 muestras duplicadas por placa junto con los 16 estándares. Las muestras se diluyeron en el tampón de ensayo que, para cada

uno de los tres protocolos, consistía en PBS + 1% de albúmina de suero bovino (BSA fracción V; Pan Biotech, nº de cat.: P06-1391100)



filtrada a través de un filtro de 0,22µm. Las muestras se diluyeron a 1:5000 para la IgA, siendo las inmunoglobulinas minoritarias, y a 1:50000 para la IgM y la IgG. Antes del ensayo, se sembraron placas de poliestireno de máxima adsorción de 96 pocillos con 100µl por pocillo de una solución de PBS + anticuerpo de captura anti-IgG porcina de cabra conjugado con HRP (peroxidasa de rábano) (AAI48; Bio-Rad, Hercules, CA, USA), anticuerpo de captura anti-porcina IgM de cabra conjugado con HRP (AAI41; Bio-Rad, Hercules, CA, USA), y anticuerpo de captura anti-porcina IgA de cabra conjugado con HRP (AAI40; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) a una dilución de 1 500.

Estas placas se incubaron durante 16 horas a 4°C para permitir la adsorción del anticuerpo a la superficie de la placa. Tras el periodo de incubación, las placas se lavaron 3 veces con PBS + 0,05% de Tween20 (CAS No.9005-64-5, Sigma-Aldrich, Burlington, MA, 01803 USA), con un descanso de 1min después de cada lavado. Una vez transcurrido el tiempo, se invirtieron vigorosamente las placas y se eliminó todo el líquido restante en los pocillos secándolo ligeramente en papel absorbente. Posteriormente, se añadieron 200µl de tampón de ensayo a todos los pocillos para bloquear los epítomos no específicos. Esta solución se incubó a 37°C con agitación suave durante 2 horas. Después de esta incubación, las placas estaban listas para la adición de muestras y estándares. Se añadieron 100µl por pocillo de las muestras a las diluciones establecidas anteriormente (IgG 1:50000, IgM e IgA 1:5000). Para las muestras de IgG, se utilizó el estándar de IgG porcina purificada (PPP012; Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.) a una dilución de 50ng/ml y, a partir de ella, se realizaron diluciones seriadas 1:1 hasta obtener una dilución mínima de 0,78ng/ml. Para las muestras de IgM, se utilizó el estándar de IgM contenido en el kit Deltaclon (NBP3-12525; Novus Biologicals, CO, USA) a una dilución de 1000ng/ml

y a partir de esta dilución se realizaron diluciones en serie de 1:2 hasta obtener una dilución mínima de 1,37ng/ml. Para las muestras de IgA, se utilizó el estándar de IgA porcina purificada Deltaclon (20017-4-1; Novus Biologicals, CO, USA) a una dilución de 400ng/ml y a partir de esta dilución se realizaron diluciones en serie de 1:2 hasta obtener una dilución mínima de 6,25ng/ml. Una vez añadidas las muestras y los estándares, las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C con agitación suave. Se volvió a realizar un lavado de 3 pases, siguiendo el mismo protocolo que el lavado anterior, y a continuación se añadió una solución del anticuerpo de detección (AAI40P, AAI41P y AAI48P) conjugado con HRP en tampón de ensayo en una proporción de 1:30000. De esta solución, se añadieron 100µl por pocillo. Esta solución se incubó durante 30 minutos a 37°C con agitación suave. Se repitió el mismo lavado anterior, pero en este caso 4 veces. Una vez completado el último lavado, se añadieron 100µl por pocillo de la solución de sustrato HRP y se procedió a la reacción hasta que se observó color en el último de los pocillos estándar (5 minutos). Transcurrido este tiempo se detuvo la reacción añadiendo 100µl por pocillo de una solución de ácido sulfúrico 2N y se midió la absorbancia a 450nm con corrección a 595nm con el lector de placas iMark (BioRad, Hercules, CA, 94547 USA).

## Estadísticas

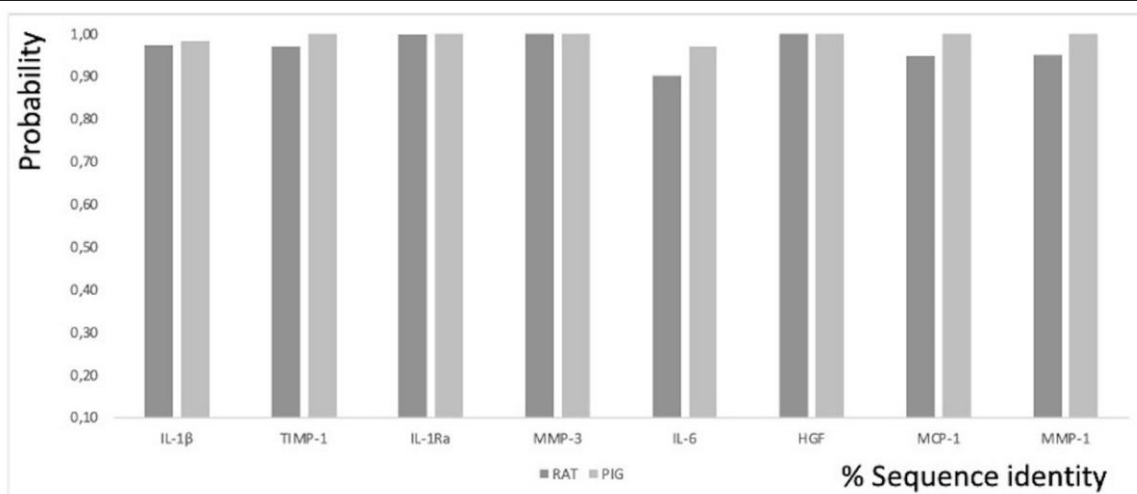
El ensayo MTT y el ensayo de cuantificación de inmunoglobulinas se sometieron a un análisis estadístico. El análisis estadístico se realizó con Excel (Microsoft, Albuquerque, Nuevo México, EEUU). Todas las estadísticas se calcularon utilizando datos de experimentos independientes por triplicado. Se realizó la prueba ANOVA para determinar las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales estudiados utilizando el software GraphPad Prism versión 8.4.0 para Mac OS X (GraphPad Software, San Diego, California, EE.UU.) para realizar los cálculos. El nivel de significación estadística se fijó en  $p < 0,05$ .

## Resultados

### Investigación de alineación de secuencias múltiples (MSA) *in-silico*

(Véase el material suplementario [Tabla S1](#) y [Tabla S2](#)).

La similitud de secuencia media expresada como porcentaje de los exones RAT que codifican citocinas RAT con los exones humanos que codifican citocinas humanas es del 75,15%. La similitud de secuencia media expresada como porcentaje de los exones de PIG que codifican citocinas de PIG con los exones humanos que codifican citocinas humanas es del 84,5%.



**Figura 1:** Patrones de conservación funcional para las anotaciones de Procesos Biológicos GO basadas en técnicas computacionales como las anotaciones electrónicas, frente al porcentaje de similitud de secuencia en las citocinas de la RAT y la PIG con respecto a las mismas citocinas humanas. Evaluación cuantitativa de la relación entre similitud de secuencia y similitud de función.

La similitud de secuencia expresada en porcentaje de los exones de ARP que codifican la IL-1β con respecto a los exones humanos que codifican la misma citoquina humana es del 75,25%, los exones de ARP que codifican la TIMP-1 con respecto a los exones humanos que codifican la misma citoquina humana es del 77,72%, los exones del RAT que codifican la IL1Ra con respecto a los exones humanos que codifican la misma citoquina humana es del 79,81%, los exones del RAT que codifican la MMP-3 con respecto a los exones humanos que codifican la misma citoquina

humana es del 81,15%, los exones del RAT que codifican la IL-6 con respecto a los exones humanos que codifican la misma citoquina humana es del 60,14%, los exones del RAT

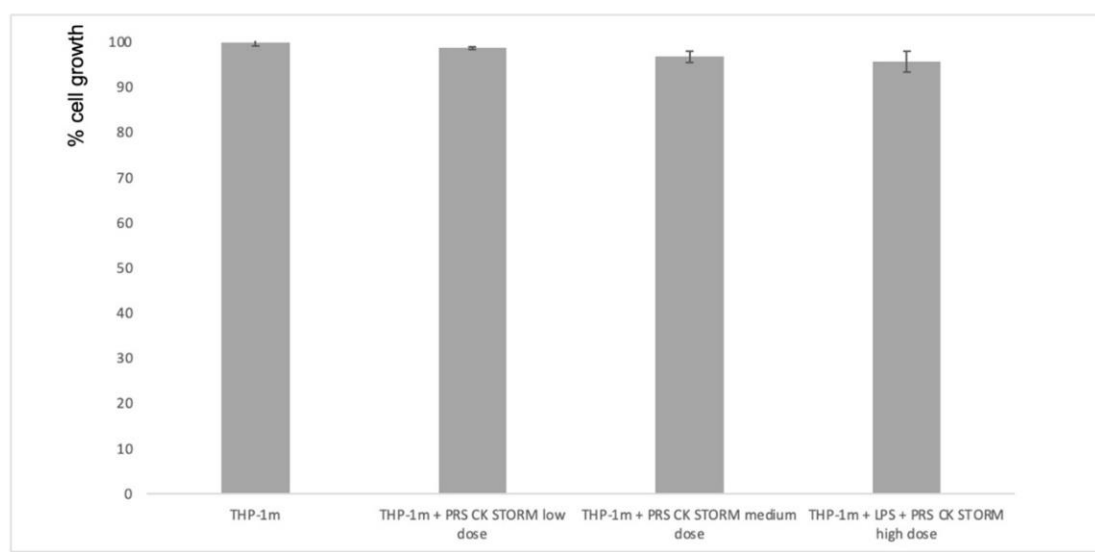
que codifican la IL-1Ra de la RAT a los exones humanos que codifican la misma citoquina humana es del 80.14%, los exones de la RAT que codifican la MCP-1 de la RAT a los exones humanos que codifican la misma citoquina humana es del 67,67%, y finalmente, los exones de la RAT que codifican la MMP-1 de la RAT a los exones humanos que codifican la misma citoquina humana es del 71,49%. La similitud de secuencia expresada en porcentaje de los exones de PIG que codifican la IL-1 $\beta$  de PIG con los exones humanos que codifican la misma citoquina humana es del 76,09%, los exones de PIG que codifican la TIMP-1 de PIG con los exones humanos que codifican la misma citoquina humana es del 88.12%, los exones de PIG que codifican la IL1Ra de

PIG a exones humanos que codifican la misma citoquina humana es del 86,11%, los exones PIG que codifican MMP-3 de PIG a exones humanos que codifican la misma citoquina humana es del 84,65%, los exones PIG que codifican IL-6 de PIG a exones humanos que codifican la misma citoquina humana es del 75,04%, los exones PIG que codifican HGF de PIG a exones humanos que codifican la misma citoquina humana es 92,77%, los exones PIG que codifican IL-6 de PIG a exones humanos que codifican la misma citoquina humana es 92,77%, los exones PIG que codifican HGF de PIG a exones humanos que codifican la misma citoquina humana es 92,77%, los exones PIG que codifican MCP-1 a

exones humanos que codifican la misma citoquina humana es del 84,33%, y por último, los exones de PIG que codifican la MMP-1 de PIG a los exones humanos que codifican la misma citoquina humana es del 88,86% (Figura 1).

### Ensayo MTT

Los resultados de la prueba MTT no muestran un aumento estadísticamente significativo en la reducción del MTT, por lo que la prueba no muestra ningún cambio en el metabolismo celular en las células THP-1m, como se esperaba de los resultados anteriores observados en el estudio *in-silico* (Figura 2).



**Figura 2:** Estimación del crecimiento celular mediante el método de reducción del MTT. Barras de la izquierda: Las PBMC de dos donantes diferentes (A) o las células THP-1 (B) se cultivaron durante 96 horas en presencia o ausencia (según se indica) de una dosis alta de PRS CK STORM, y se determinó la reducción de MTT. Barras de la derecha: Las PBMC (A) o las células THP1 (B) se estimularon con 100pg/mL o 10ng/mL, respectivamente, durante 96 horas y se cultivaron durante este tiempo en presencia o ausencia (como se indica) de 10µg/ml de HC o con diferentes dosis del secretoma. Las dosis fueron bajas (x1), medias (x2,5) o altas (x5). Los datos se expresan como porcentaje de crecimiento celular en comparación con las células de control no tratadas en cada caso y representan la media  $\pm$  DE de dos experimentos realizados por triplicado: \*, valores  $p < 0,05$ .

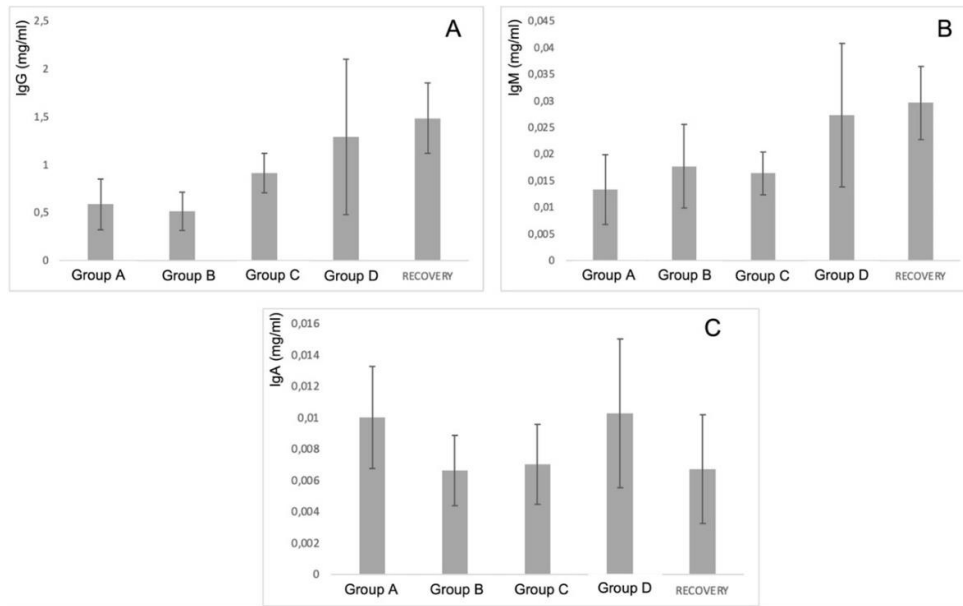
### Prueba de inmunogenicidad *in vivo* en condiciones BPL (buenas prácticas de laboratorio)

En primer lugar, se analizaron los resultados de las pruebas *in vivo* realizadas en 140 ratas tratadas con PRS CK STORM en 3 dosis diferentes. La figura 3 muestra los resultados del análisis de las 3 inmunoglobulinas estudiadas.

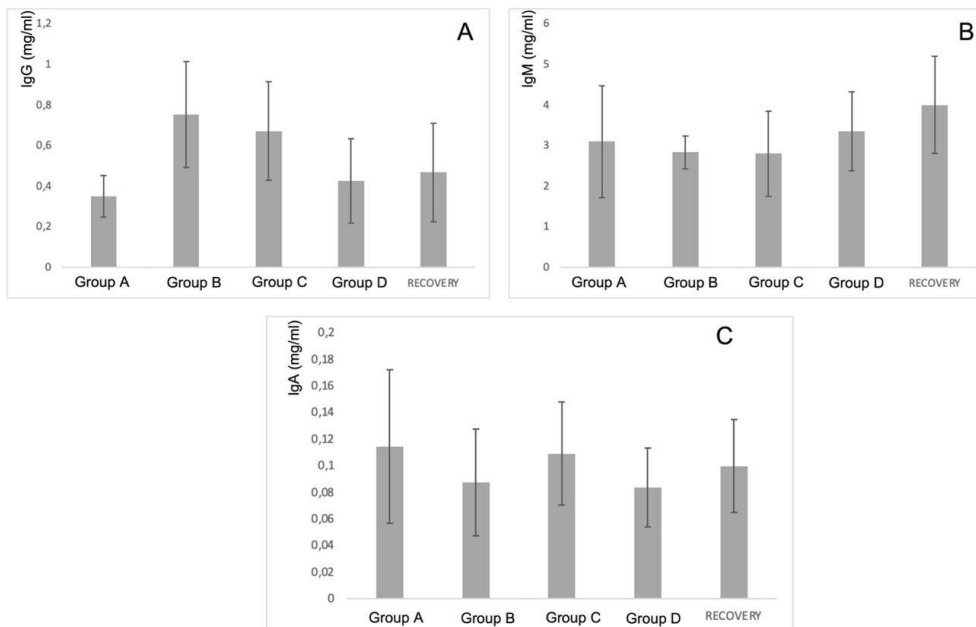
En la tabla 4 se muestran las medias de las diferencias encontradas en los valores de las distintas inmunoglobulinas estudiadas, tanto al final del tratamiento como las encontradas en los grupos de recuperación 14 días después del final del tratamiento, junto con sus desviaciones estándar, así como el resultado del análisis comparativo mediante la prueba t de Student para evaluar la posible existencia de diferencias estadísticamente significativas. Datos completos de todas las determinaciones en todos los animales de experimentación

están disponibles en la (Tabla S3) del material suplementario.

En segundo lugar, se analizaron los resultados de las pruebas *in vivo* en los 40 minipigs tratados con PRS CK STORM en 3 dosis diferentes. La figura 4 muestra los resultados del análisis de las 3 inmunoglobulinas estudiadas. La tabla 5 muestra las medias de las diferencias encontradas en los valores de las diferentes inmunoglobulinas estudiadas, tanto al final del tratamiento como las encontradas en los grupos de recuperación 14 días después del final del tratamiento, junto con sus desviaciones estándar, así como el resultado del análisis comparativo mediante la prueba t de Student para evaluar la posible existencia de diferencias estadísticamente significativas. Los datos completos de todas las determinaciones en todos los animales analizados están disponibles en la Tabla S3 del material suplementario.



**Figura 3:** Figura 3A: media, desviación estándar y significación en los valores de IgG después de restar el valor de la Predosis del valor de la muestra en el día 15 en todos los grupos. Para el grupo de recuperación la diferencia corresponde al día 29 en comparación con la Predosis para los animales de recuperación Grupo D. Ningún grupo muestra diferencias estadísticamente significativas; Las diferencias en el grupo D provienen de sólo 4 individuos que alteran la media global (31, 71, 72 y 74). Figura 3B: media, desviación estándar y significación de los valores de IgM tras restar el valor de la Predosis del valor de la muestra del día 15 en todos los grupos. Para el grupo de recuperación, la diferencia corresponde al día 29 en comparación con la predosis para los animales de recuperación del grupo D. Ningún grupo muestra diferencias estadísticamente significativas. Figura 3C: media, desviación estándar y significación en los valores de IgA tras restar el valor de Predose del valor de la muestra en el día 15 en todos los grupos. Para el grupo de recuperación, la diferencia corresponde al día 29 en comparación con la predosis para los animales de recuperación del grupo D. Ningún grupo muestra diferencias estadísticamente significativas.



**Figura 4:** Figura 4A: media, desviación estándar y significación en los valores de IgG tras restar el valor de la predosis del valor de la muestra en el día 15 en todos los grupos. Para el grupo de recuperación la diferencia corresponde al día 29 en comparación con la predosis para los animales de recuperación del grupo D. Ningún grupo muestra diferencias estadísticamente significativas; Las diferencias en el grupo D provienen de sólo 4 individuos que alteran la media global (31, 71, 72 y 74). Figura 4B: media, desviación estándar y significación de los valores de IgM tras restar el valor de la predosis del valor de la muestra del día 15 en todos los grupos. Para el grupo de recuperación, la diferencia corresponde al día 29 en comparación con la predosis para los animales de recuperación del grupo D. Ningún grupo muestra diferencias estadísticamente significativas. Figura 4C: media, desviación estándar y significación de los valores de IgA tras restar el valor de la predosis del valor de la muestra el día 15 en todos los grupos. Para el grupo de recuperación la diferencia corresponde al día 29 en comparación con la predosis para los animales de recuperación Grupo D. Ningún grupo muestra diferencias estadísticamente significativas.

**Tabla 4:** Media y desviación estándar de cada grupo y resultado de la prueba t de Student.

Grupo IgG	Media (mg/mL)	Desviación estándar	t Estudiante calculado	T Estudiante
$\Delta A$	0.58650835	0.53213216		
$\Delta B$	0.51196376	0.40048492	0.5730412	2.1016
$\Delta C$	0.51196376	0.769138376	0.01861136	1.734
$\Delta D$	0.91266069	0.41124138	0.0303497	2.0017
$\Delta RECOVERY$	1.28936408	1.62087066	0.524536699	2.1009
Grupo IgM	Media (mg/mL)	Desviación estándar	t Estudiante	T Estudiante
A	0.01335271	0.01307318		
B	0.01769687	0.01570027	0.29359557	2.1016
C	0.0163494	0.00802754	0.32071308	1.734
D	0.02731833	0.02690038	0.01424379	2.0017
RECUPERACIÓN	0.02961825	0.013689	0.632465781	2.1009
Grupo IgA	Media (abs)	Desviación estándar	t Estudiante	T Estudiante
A	0.0100206	0.00651366		
B	0.00661777	0.00449748	0.05877641	2.1016
C	0.007020124	0.005125366	0.09093395	1.734
D	0.01029195	0.00950421	0.90434447	2.0017
RECUPERACIÓN	0.00672162	0.00697055	2.90218E-06	2.1009

**Tabla 5:** Media y desviación estándar de cada grupo y resultado de la prueba t de Student.

Grupo IgG	Media (mg/mL)	Desviación estándar	t Estudiante calculado	T Estudiante
$\Delta A$	0.348056	0.203632		
$\Delta B$	0.75136937	0.520705	0.06852999	1.734
$\Delta C$	0.67009016	0.48232402	0.10907274	1.734
$\Delta D$	0.42494522	0.41382023	0.5716168	1.725
$\Delta RECOVERY$	0.46708245	0.48513761	0.93851344	1.943
Grupo IgM	Media (mg/mL)	Desviación estándar	t Estudiante	T Estudiante
A	3.08752	2.760176		
B	2.8253415	0.806907	0.79838295	1.734
C	2.79105338	2.08291	0.7878425	1.734
D	3.34393493	1.95161032	0.79544957	1.725
RECUPERACIÓN	0.18475	0.17572825	0.0402449	1.943
Grupo IgA	Media (abs)	Desviación estándar	t Estudiante	T Estudiante
A	0.114005	0.115337		
B	0.0869985	0.080267	0.54479021	1.734
C	0.10889609	0.07755511	0.90702765	1.734
D	0.08319585	0.05951399	0.42264317	1.725
RECUPERACIÓN	0.09950849	0.06953903	0.28691412	1.943

## Discusión

En cuanto a las pruebas in-silico realizadas para predecir una posible reacción de inmunogenicidad, debemos recordar que estamos utilizando un sistema de producción de proteínas que es eucariota, y al no haber diferencias de secuencia (entre humanos) no debería causar inmunogenicidad.

La aplicación de algoritmos de alineación de secuencias para la identificación de antígenos es problemática por varias razones y puede producir resultados ambiguos o fallar. Por ejemplo, algunas proteínas que no tienen una similitud de secuencia obvia y que se forman a través de la evolución (divergente o convergente), pueden compartir propiedades y estructura similares [18]. Además, en algunos casos la antigenicidad (como propiedad)



los exones mediante BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) los exones se conservan en un porcentaje muy alto, lo que demuestra que estas proteínas mantendrían la misma función independientemente de la especie a la que perteneciera, por lo que a priori estas citoquinas no serían reconocidas como extrañas a no ser que se administraran a dosis muy altas. Estos alineamientos también coinciden con los de las proteínas, y también muestran que las regiones funcionales están muy conservadas. Como puede verse en la Figura 2, las secuencias de los exones de los genes que codifican las citoquinas estudiadas en ratas y cerdos son similares en función y secuencia a los exones de los genes que codifican las mismas citoquinas humanas, por lo que no cabe esperar reacciones inmunológicas interespecíficas [23].

Otro aspecto a discutir es cuanto a la predicción de la posible inmunogenicidad del PRS CK STORM es que en las dosis a las que se utiliza, incluso en la dosis más alta, las citocinas que tenemos en el PRS CK STORM, así como todos los demás componentes, suelen estar en una concentración más alta en el plasma humano, es decir, no va a haber un gran aumento de estos factores. En todos los casos en los que se ha informado de inmunogenicidad/ADAs en la literatura, se trata de casos en los que se estaba utilizando una proteína exógena (producida en otro sistema no eucariótico) o una proteína a dosis mucho más altas que las que se encuentran en el plasma, y la circunstancia da lugar a inmunogenicidad [24].

El MTT puede estar relacionado con la inmunogenicidad del producto, ya que si alguno de los factores presentes en PRS CK STORM fuera reconocido como exógeno o antigénico, las células THP-1m reaccionarían a estos factores, aumentando su metabolismo y, por lo tanto, dando mayores reducciones de MTT en comparación con el control no tratado, y como se ve en los resultados, esto no ha ocurrido [25].

Las concentraciones de inmunoglobulinas encontradas en las muestras analizadas en las ratas fueron menores o similares al rango de concentraciones reportadas en la literatura [26], excepto el nivel de IgM en los animales 3, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 24, 25, 25, 26, 28, 30, 31, 36, 37, 38, 39 y 40. Las diferencias en las concentraciones podrían deberse a variaciones experimentales que no afectan a las comparaciones entre individuos o grupos estudiados. De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, no se ha encontrado ningún individuo de ningún grupo que muestre incrementos en la concentración de inmunoglobulina superiores a los encontrados en el grupo de control (A), al que se le inyectó vehículo. La mayoría de los animales de todos los grupos no mostraron diferencias estadísticamente significativas cuando se analizaron los aumentos intraindividuales de cada inmunoglobulina normalizados en porcentaje en relación con los cambios porcentuales normalizados observados en el grupo A a los 15 días. En particular, dos animales del grupo B (ID5 [74,27%] e ID7 [50,09%]), dos animales del grupo C (ID9

[44,27%] e ID11 [91,05%]) y tres animales del grupo D (ID13 [47,33%], ID14 [44,88%] e ID35 [48,72%]) mostraron un aumento de la IgG normalizada en porcentaje con diferencias estadísticamente significativas en comparación con la máxima diferencia normalizada observada en el grupo A.

Cuando analizamos las diferencias de los aumentos intraindividuales normalizados en porcentaje de cada inmunoglobulina en relación con las variaciones porcentuales normalizadas observadas en el grupo A a los 29 días, encontramos que un animal del grupo de recuperación de dosis altas de D (ID36 [51,11%]) mostró un aumento de IgG y tres animales del grupo de recuperación de dosis altas de D (ID35 [168,76%], ID36 [364,57%] e ID39 [194,59%]) mostraron un aumento de IgM normalizado en porcentaje con diferencias estadísticamente significativas en comparación con la máxima diferencia normalizada observada en el grupo A. Para la IgA, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de control y de tratamiento a los 15 y 29 días. Además, cuando se analizó estadísticamente la variabilidad de la concentración de IgG, IgA e IgM por grupos, no se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre el grupo control y el resto de los grupos, por lo que los resultados en general no parecen responder a una reacción inmunológica al producto inyectado.

Las concentraciones de inmunoglobulinas encontradas en las muestras analizadas en los minipigs (Tabla S4 del material suplementario) fueron inferiores al rango de concentraciones reportado en la literatura, excepto para el nivel de IgA. Las diferencias en las concentraciones podrían deberse a variaciones experimentales que no afectan a las comparaciones entre individuos o grupos estudiados. Según los resultados obtenidos en este estudio, en ningún individuo de los grupos B y C (dosis baja y media) se observaron aumentos de la concentración de inmunoglobulinas superiores a los encontrados en el grupo de control (A), al que se le inyectó vehículo. En cambio, sólo se detectó un aumento de IgG en 4 individuos (números de identificación 31, 71, 72 y 74), todos ellos del grupo de dosis más alta (D), incluidos los individuos del grupo de recuperación, lo que significa que encontramos un aumento en el 13,3% (4/30) de los individuos del grupo D. De los 4 individuos con aumento de IgG, uno era varón y tres eran mujeres. El individuo 31 mostró los valores más altos y fue el principal contribuyente a los valores medios. Además, cuando se analizó estadísticamente la variabilidad de la concentración de IgG por grupos, no se encontraron diferencias significativas ( $\alpha = 0,05$ ) entre el grupo control y el resto de los grupos, por lo que los resultados en general no parecen responder a una reacción inmunológica al producto inyectado. Sin embargo, son destacables los valores encontrados en cuatro animales del grupo D, que, aunque significativamente superiores a los del grupo control, están dentro de los valores considerados normales por la bibliografía (IgG: 14,89-30,01) [27-31].



## Conclusiones

Dados los resultados obtenidos en los diferentes ensayos realizados, tanto *in silico*, como *in vitro* e *in vivo*, podemos afirmar que el PRS CK STORM, medio condicionado procedente del cultivo indirecto de macrófagos M2 con MSCs, no tiene capacidad de generar reacciones de inmunogenicidad (ADAs) a las dosis ensayadas.

## Patentes

Este trabajo de investigación ha dado lugar a la patente PCT/EP2020/059365 "Composición para la regeneración de tejidos, método de producción y usos de la misma".

## Materiales complementarios

Los siguientes datos están disponibles como material suplementario. Tabla S1: Resultados MSA gen total de citoquinas, quimioquinas, y factores de crecimiento.

Tabla S2: Resultados del gen de los exones MSA de las citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento.

Tabla S3: Análisis de las inmunoglobulinas de la RAT. Tabla S4: Análisis de inmunoglobulinas del MINIPIG.

## Contribuciones de los autores

Todos los autores contribuyeron a la concepción y diseño del estudio. La preparación del material, la recogida de datos y el análisis fueron realizados por Juan Pedro Lapuente, Joaquín Marco-Brualla, Gonzalo Gómez, Paula Desportes, Jara Sanz, Pablo Fernández, Marco García-Gil, Fernando Bermejo, Juan V. San Martín, Alicia Algaba, Daniel Lapuente, Almudena De Gregorio, Belén Lapuente y Sergio Gómez. El primer borrador del manuscrito fue escrito por Juan Pedro Lapuente y Alberto Anel, y todos los autores comentaron las versiones anteriores del manuscrito. Todos los autores leyeron y aprobaron el manuscrito final.

## Declaración de consentimiento informado

Se obtuvo el consentimiento informado de todos los donantes que participaron en el estudio.

## Declaración de la Junta de Revisión Institucional

El estudio *in vivo* se llevó a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki en Vivotecnia research S.L. (Madrid, España) que cuenta con un Certificado de Cumplimiento de Buenas Prácticas de Laboratorio Ref: BPL I/21.10/47-CM ([Anexo 1](#)).

## Declaración de disponibilidad de datos

Los conjuntos de datos generados y/o analizados durante el

presente estudio están disponibles a través de los autores correspondientes previa solicitud razonable.

Los autores declaran que no tienen ningún conflicto de intereses financiero o personal que pueda influir de forma inapropiada en la realización de esta investigación.

## Referencias

- Schellekens H (2002) Immunogenicity of therapeutic proteins: clinical implicaciones y perspectivas. *Clin Ther* 24(11): 1720-1740.
- Van Schouwenburg PA, Rispens T, Wolbink GJ (2013) Immunogenicity of anti-TNF biologic therapies for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 9(3): 164-172.
- Bloem K, Hernández Breijo B, Martínez Feito A, Rispens T (2017) Inmunogenicidad de los anticuerpos terapéuticos: La monitorización de los anticuerpos antidroga en un contexto clínico. *Ther Drug Monit* 39(4): 327-332.
- Bedolla Pulido TR, Mariscal Castro J, González Mendoza T, Morales Romero J, Bedolla Barajas M (2020) Urticaria por frío y riesgo de anafilaxia en tratamiento con omalizumab. A propósito de un caso. *Rev Alerg Mex* 67(4): 408-412.
- FDA (2019) Immunogenicity testing of therapeutic protein products-developing and validating assays for anti-drug antibody detection. Guía para la industria. Administración de Alimentos y Medicamentos del Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos. Centro de Evaluación e Investigación de Medicamentos (CDER). Centro de Evaluación e Investigación de Productos Biológicos (CBER).
- EMA (2017) Directriz sobre la evaluación de la inmunogenicidad de las proteínas terapéuticas. Agencia Europea de Medicamentos.
- Vultaggio A, Nencini F, Bormioli S, Silvestri E, Dies L, et al. (2021) Se inducen células Treg específicas del fármaco durante el procedimiento de desensibilización para rituximab y tocilizumab en pacientes con anafilaxia. *Sci Rep* 11(1): 12558.
- Lee JL, Linterman MA (2022) Mechanisms underpinning poor antibody respuestas a las vacunas en el envejecimiento. *Immunol Lett* 241: 1-14.
- Weeraratne DK, Kuck AJ, Chirmule N, Mytych DT (2013) Medición del anticuerpo IgG4 contra el agente estimulante de la eritropoyesis como indicador de la aplasia pura de eritrocitos mediada por anticuerpos. *Clin Vaccine Immunol* 20(1): 46-51.
- Bartelds GM, Kriekaert CL, Nurmohamed MT, van Schouwenburg PA, Lems WF, et al. (2011) Desarrollo de anticuerpos contra adalimumab y asociación con la actividad de la enfermedad y el fracaso del tratamiento durante el seguimiento a largo plazo. *JAMA* 305(14): 1460-1468.
- Hofbauer CJ, Whelan SF, Hirschler M, Allacher P, Horling FM, et al. (2015) La afinidad de los anticuerpos específicos del FVIII revela importantes diferencias entre los anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes en los seres humanos. *Blood* 125(7): 1180-1188.
- Rane SS, Dearman RJ, Kimber I, Derrick JP (2022) Adaptación de un ensayo ELISA para la detección de respuestas IgG2a contra anticuerpos monoclonales terapéuticos en un modelo de inmunización de ratón. *J Immunotoxicol* 19(1): 1-7.
- Fowell D, Mason D (1993) Evidencia de que el repertorio de células T de ratas normales contiene células con el potencial de causar diabetes. Caracterización del subconjunto de células T CD4+ que inhibe este potencial autoinmune. *J Exp Med* 177(3): 627-636.
- Reijonen H, Novak EJ, Kochik S, Heninger A, Liu AW, et al. (2002) Detección de células T específicas de GAD65 mediante tetrámeros del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II en pacientes diabéticos de tipo 1 y sujetos de riesgo. *Diabetes* 51(5): 1375-1382.
- Forsthuber TG, Shive CL, Wienhold W, de Graaf K, Spack EG, et al. (2001) Los epítopos de células T de la glicoproteína de oligodendrocitos de mielina humana identificados en ratones transgénicos HLA-DR4 (DRB1\*0401) son encefalitogénicos y son presentados por células B humanas. *J Immunol* 167(12): 7119-7125.

16. Keech CL, Farris AD, Beroukas D, Gordon TP, McCluskey J (2001) La ayuda de los linfocitos T coadyuvantes es suficiente para desencadenar autoanticuerpos antinucleares en ratones ingenuos. *J Immunol* 166(9): 5826-5834.
17. Chowdhury B, Garai G (2017) Una revisión sobre la alineación múltiple de secuencias desde la perspectiva del algoritmo genético. *Genomics* 109(5-6): 419-431.
18. Petsko GA, Ringe D (2004) *Protein structure and function*. Blackwell Publishing. Londres, Reino Unido.
19. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) Clustal W Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22(22): 4673-4680.
20. Sievers F, Higgins DG (2014) Clustal omega. *Curr Protoc Bioinformatics* 48: 1-16.
21. Lapuente JP, Blázquez-Martínez A, Marco Brualla J, Gómez G, Desportes P, et al. (2022) Cytokine Profile and Anti-Inflammatory Activity of a Standardized Conditioned Medium Obtained by Coculture of Monocytes and Mesenchymal Stromal Cells (PRS CK STORM). *Biomolecules* 12: 534.
22. Chen S, Sugiyama K, Inamura M, Tanaka S, Onda K, et al. (2016) Efectos de la insulina en la farmacodinámica de los fármacos inmunosupresores contra las células mononucleares de sangre periférica humana activadas por mitógenos. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 38(5): 372-378.
23. Joshi T, Xu D (2007) Quantitative assessment of relationship between sequence similarity and function similarity. *BMC Genomics* 8: 222.
24. Van Mierlo GJ, Cnubben NH, Kuper CF, Wolthoorn J, van Meeteren Kreikamp AP, et al. (2013) The Göttingen minipig® as an alternative non-rodent species for immunogenicity testing: a demonstrator study using the IL-1 receptor antagonist anakinra. *J Immunotoxicol* 10(1): 96-105.
25. Hernández Y, González Pastor R, Belmar López C, Mendoza G, Fuente J, et al. (2019) Recubrimientos de nanopartículas de oro como portadores eficientes de adenovirus a células madre no infecciosas. *RSC Advances* 1327-1334.
26. Vargas Mamani JJ (2020) Parámetros bioquímicos y sanguíneos de la rata de laboratorio (*Rattus norvegicus*): revisión de la literatura. *Revista Médica Basadrina* 14(1): 52-55.
27. Goding JW (1978) Allotypes of IgM and IgD receptors in the mouse: a probe for lymphocyte differentiation. *Contemp Top Immunobiol* 8: 203-243.
28. Inoue T (1981) Possible factors influencing the immunoglobulin M concentration in swine colostrum. *Am J Vet Res* 42(8): 1429-1432.
29. Kojima CJ, Kattesh HG, Roberts MP, Sun T (2008) Physiological and immunological responses to weaning and transport in the young pig: modulation by administration of porcine somatotropin. *J Anim Sci* 86(11): 2913-2919.
30. Halliwell R, Gorman NT (1989) *Veterinary Clinical Immunology*. WB Saunders Co. Philadelphia, USA.
31. Tizard I (1982) *An Introduction to Veterinary Immunology*. W.B. Saunders Co., Philadelphia, USA.