



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**Obtención de una novedosa formulación que permita la nanoencapsulación de interferón  
alfa 2b recombinante humano (rhIFN $\alpha$ -2b)**

Villacís Aguirre, Carlos Alexis

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Dra. Ramos Gómez, Thelvia Isabel, Ph.D.(c)

12 de marzo de 2021

## Hoja de resultados de la herramienta Urkund



### Document Information

<b>Analyzed document</b>	Villacis_Carlos_Trabajo_Titulacion_Urkund.docx (D98050658)
<b>Submitted</b>	3/12/2021 4:33:00 AM
<b>Submitted by</b>	
<b>Submitter email</b>	cavillacsa@espe.edu.ec
<b>Similarity</b>	1%
<b>Analysis address</b>	tiramos.espe@analysis.orkund.com

### Sources included in the report

<b>W</b>	URL: <a href="http://catalogoinsp.mx/files/tes/12935.pdf">http://catalogoinsp.mx/files/tes/12935.pdf</a> Fetched: 1/10/2021 2:40:41 PM	 3
<b>SA</b>	<b>Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / TESIS_PAEZ ESPINOZA VANESSA MARGARITA_orkund.docx</b> Document TESIS_PAEZ ESPINOZA VANESSA MARGARITA_orkund.docx (D54106120) Submitted by: vmpaez1@espe.edu.ec Receiver: tiramos.espe@analysis.orkund.com	 5
<b>SA</b>	<b>Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE / Carla Villavicencio Urkund.docx</b> Document Carla Villavicencio Urkund.docx (D78008264) Submitted by: cjvillavicencio@espe.edu.ec Receiver: tiramos.espe@analysis.orkund.com	 1
<b>W</b>	URL: <a href="http://tesis.sld.cu/FileStorage/000185-6912-SaezMtezV.pdf">http://tesis.sld.cu/FileStorage/000185-6912-SaezMtezV.pdf</a> Fetched: 1/11/2021 4:11:01 PM	 1
<b>SA</b>	<b>tesis mateo urkund.docx</b> Document tesis mateo urkund.docx (D75265450)	 1

THELVIA  
ISABEL  
RAMOS  
GOMEZ

Firmado digitalmente por  
THELVIA ISABEL  
RAMOS GOMEZ  
Fecha: 2021.03.12  
12:01:25 -03'00'



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

### Certificación

Certifico que el trabajo de titulación, “**Obtención de una novedosa formulación que permita la nanoencapsulación de interferón alfa 2b recombinante humano (rhIFN $\alpha$ -2b)**” fue realizado por el señor **Villacís Aguirre, Carlos Alexis** el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 12 de marzo de 2021

THELVIA  
ISABEL RAMOS  
GOMEZ

Firmado digitalmente  
por THELVIA ISABEL  
RAMOS GOMEZ  
Fecha: 2021.03.12  
13:56:12 -03'00'..

**Ramos Gómez, Thelvia Isabel**

C. C.: 1753960028



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Responsabilidad de autoría**

Yo, **Villacís Aguirre, Carlos Alexis**, con cédula de ciudadanía n° 1724192248, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Obtención de una novedosa formulación que permita la nanoencapsulación de interferón alfa 2b recombinante humano (rhIFN $\alpha$ -2b)”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 11 de marzo de 2021

**Villacís Aguirre, Carlos Alexis**

C.C.: 1724192248



**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología**

**Autorización de publicación**

Yo **Villacís Aguirre, Carlos Alexis**, con cédula de ciudadanía n° 1724192248, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Obtención de una novedosa formulación que permita la nanoencapsulación de interferón alfa 2b recombinante humano (rhIFN $\alpha$ -2b)”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 11 de marzo de 2021

**Villacís Aguirre, Carlos Alexis**

C.C.: 1724192248

## Dedicatoria

*A Dios, mi Eterno Papá, por Su amor, Su misericordia y Su gracia*

*A mis padres, Gustavo y Verónica, quienes me han apoyado de forma incondicional*

*A mi hermana Karen, heroína sin capa en estos tiempos tan complejos*

*A mis abuelos, Fanny, Ángel, Genoveva y Alberto, figuras claves en mi crianza*

**Carlos Alexis Villacís Aguirre**

## **Agradecimientos**

*En primer lugar, como en todo, debo darle gracias a mi Dios, pues Él me trajo a este mundo con un propósito, que espero cumplir todos los días de mi vida. A pesar del momento tan complicado que estamos viviendo, nunca me ha soltado de Su mano. Todos mis conocimientos, habilidades y talentos son por y para mi Papá.*

*Mis más sinceros agradecimientos a la Dra. Thelvia Ramos, por acogerme primero como su alumno ayudante, y ahora como su tesista. Los valores académicos, científicos y humanos que ha aportado en mi formación son inconmensurables.*

*Al Dr. Jorge Toledo, a la distancia le extiendo mi estima y agradecimiento, por abrirme las puertas de su laboratorio, y depositar su confianza en mi trabajo. Sin duda su apoyo fue fundamental en la travesía emprendida en tierras lejanas.*

*Un merecido agradecimiento al Dr. Seidy Pedroso, y a su esposa, la Dra. Noralvis Salazar. Gracias a su voluntad de enseñanza y vasta paciencia logré cumplir con mis actividades sin mayores contratiempos.*

*Mi eterna gratitud a mis padres, Verónica y Gustavo, por su amor, apoyo y sacrificio. Por la educación y los valores que me han inculcado, que me han llevado hasta este punto. Aunque separarme de ellos fue duro, su aliento nunca hizo falta. A la Dra. Karen, por su apoyo incondicional y los consejos que me ha brindado como hermana mayor.*

*Un incuantificable agradecimiento a mis amigos más cercanos Edwin, María Soledad, Aracely y Ricardo, por soportar tantas veces mi mal genio. De la misma manera a mis compañeros de aventura, Angy, Carla, Bryan, Fernando, Luis y Santiago.*

## Índice de contenidos

Hoja de resultados de la herramienta Urkund.....	2
Certificación .....	3
Responsabilidad de autoría .....	4
Autorización de publicación .....	5
Índice de contenidos.....	8
Índice de tablas .....	11
Índice de figuras.....	12
Abreviaturas .....	14
Resumen .....	16
Abstract .....	17
Capítulo 1 .....	18
Introducción .....	18
<b>Formulación del problema y antecedentes</b> .....	18
Justificación del problema .....	23
Objetivos de la Investigación .....	28
<i>Objetivo General</i> .....	28
<i>Objetivos Específicos</i> .....	28
Capítulo 2 .....	29
Marco teórico .....	29
Proteínas recombinantes.....	29
Interferones (IFNs).....	30
Interferones de tipo I.....	33
Interferón alfa (IFN $\alpha$ ).....	34
<i>Subtipos de IFN<math>\alpha</math></i> .....	35
<i>Señalización y activación de la expresión de IFN<math>\alpha</math></i> .....	36
<i>Actividad antiviral del IFN<math>\alpha</math></i> .....	40
<i>Actividad antiproliferativa del IFN<math>\alpha</math></i> .....	42
<i>IFN<math>\alpha</math> en la inmunidad innata y adaptativa</i> .....	43
<i>Rol del IFN<math>\alpha</math> en la inmunidad mucosal</i> .....	44
<i>Uso clínico del IFN<math>\alpha</math></i> .....	47

Nanopartículas.....	49
<i>Nanopartículas poliméricas</i> .....	51
<i>Quitosano (CS)</i> .....	52
Síntesis de nanopartículas mediante <i>electrospray</i> .....	53
Caracterización física de nanopartículas .....	58
<i>Distribución de tamaño</i> .....	59
<i>Carga superficial</i> .....	61
Capítulo 3 .....	62
Materiales y métodos .....	62
Diseño experimental .....	62
Producción de rhIFN $\alpha$ -2b en <i>E. coli</i> .....	62
Purificación de rhIFN $\alpha$ -2b .....	63
<i>Ruptura de la biomasa</i> .....	63
<i>Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE y Western Blot</i> .....	64
<i>Ultrafiltración de la fracción soluble</i> .....	65
<i>Cromatografía de modo mixto (MMC)</i> .....	65
<i>Cromatografía de intercambio iónico (IEX)</i> .....	66
<i>Concentración de la proteína</i> .....	67
<i>Cuantificación de la concentración de proteínas totales</i> .....	67
<i>Cromatografía de exclusión molecular</i> .....	68
<i>Determinación de la pureza de rhIFN<math>\alpha</math>-2b</i> .....	69
<i>Cambio de buffer</i> .....	69
Evaluación de la actividad biológica de rhIFN $\alpha$ -2b .....	70
<i>Evaluación de la actividad antiviral</i> .....	70
<i>Evaluación de la actividad antiproliferativa</i> .....	71
Encapsulación de rhIFN $\alpha$ -2b en CS-NPs .....	72
<i>Estandarización de la síntesis de CS-NPs blanco</i> .....	72
<i>Estandarización de la síntesis de CS-NPs con rhIFN<math>\alpha</math>-2b</i> .....	72
Evaluación de los sistemas de liberación de IFN $\alpha$ y su relación con la actividad biológica.....	73
Análisis estadístico de los ensayos de actividad biológica.....	73
Capítulo 4 .....	75

	10
<b>Resultados</b> .....	75
<b>Producción de rhIFN<math>\alpha</math>-2b en <i>E. coli</i></b> .....	75
<b>Purificación de rhIFN<math>\alpha</math>-2b</b> .....	76
<i>Ruptura de la biomasa</i> .....	77
<i>Ultrafiltración de la fracción soluble</i> .....	78
<i>Cromatografía de modo mixto (MMC)</i> .....	79
<i>Cromatografía de intercambio iónico (IEX)</i> .....	80
<i>Concentración de la proteína</i> .....	81
<i>Cromatografía de exclusión molecular (SEC)</i> .....	82
<i>Determinación de la pureza de rhIFN<math>\alpha</math>-2b</i> .....	83
<b>Evaluación de la actividad biológica de rhIFN<math>\alpha</math>-2b</b> .....	86
<i>Evaluación de la actividad antiviral</i> .....	86
<i>Evaluación de la actividad antiproliferativa</i> .....	88
<b>Selección de parámetros para la síntesis de NPs</b> .....	89
<b>Análisis de las NPs mediante microscopía electrónica</b> .....	92
<i>CS-NPs blanco</i> .....	92
<i>CS-NPs con rhIFN<math>\alpha</math>-2b encapsulado</i> .....	93
<b>Evaluación de los sistemas de liberación de IFN<math>\alpha</math> y su relación con la actividad biológica</b> .....	96
<b>Capítulo 5</b> .....	104
<b>Discusión</b> .....	104
<b>Capítulo 6</b> .....	114
<b>Conclusiones</b> .....	114
<b>Capítulo 7</b> .....	115
<b>Recomendaciones</b> .....	115
<b>Capítulo 8</b> .....	116
<b>Referencias bibliográficas</b> .....	116

**Índice de tablas**

Tabla 1. <i>Terapias en desarrollo basadas en nanotecnología</i> .....	50
Tabla 2. <i>Resumen estadístico de la regresión logística de 4 parámetros</i> .....	87
Tabla 3. <i>Configuraciones del equipo utilizadas en la síntesis de NPs</i> .....	90

## Índice de figuras

Figura 1. <i>Rutas de inducción de IFNs tipo I y señalización del receptor</i> .....	40
Figura 2. <i>Configuraciones de la técnica de electrospray</i> .....	55
Figura 3. <i>Influencia del voltaje aplicado en la formación del cono de Taylor</i> .....	56
Figura 4. <i>Crecimiento de los cultivos en función del tiempo</i> .....	76
Figura 5. <i>SDS-PAGE y Western Blot de las fracciones obtenidas en la ruptura celular</i> .	77
Figura 6. <i>SDS-PAGE de las fracciones obtenidas en la ultrafiltración</i> .....	78
Figura 7. <i>Presencia de rhIFN<math>\alpha</math>-2b en las diferentes fracciones obtenidas en las cromatografías</i> .....	80
Figura 8. <i>Curva de calibración para el ensayo BCA luego de la concentración</i> .....	82
Figura 9. <i>SDS-PAGE de la proteína purificada a diferentes volúmenes cargados</i> .....	83
Figura 10. <i>Curva de calibración para el ensayo BCA posterior a la determinación de la pureza</i> .....	84
Figura 11. <i>Curva de calibración para el ensayo BCA luego de la filtración y diálisis</i> .....	85
Figura 12. <i>Curvas dosis-respuesta del IFN<math>\alpha</math>-2b STD y del rhIFN<math>\alpha</math>-2b</i> .....	87
Figura 13. <i>Comparación de la viabilidad celular en cada tratamiento con rhIFN<math>\alpha</math>-2b</i> .....	89
Figura 14. <i>Cono de Taylor formado durante la síntesis de CS-NPs</i> .....	91
Figura 15. <i>Productos de la síntesis de CS-NPs</i> .....	92
Figura 16. <i>Micrografía SEM de las CS-NPs blanco</i> .....	93
Figura 17. <i>Morfología esférica de las CS-NPs con rhIFN<math>\alpha</math>-2b</i> .....	94
Figura 18. <i>Micrografía SEM de CS-NPs pequeñas y aglomerados de CS</i> .....	94
Figura 19. <i>Micrografía STEM de las CS-NPs con rhIFN<math>\alpha</math>-2b</i> .....	95
Figura 20. <i>Micrografía TEM de las CS-NPs con rhIFN<math>\alpha</math>-2b</i> .....	96

Figura 21. *Patrones observados de liberación de NPs con IFN $\alpha$  encapsulado.....* 100

**Abreviaturas**

BCA	Ácido bicinconínico
CPE	Efecto citopático
CS	Quitosano
CS-NPs	Nanopartículas de quitosano
DCs	Células dendríticas
DLS	Dispersión dinámica de luz
EC <sub>50</sub>	Concentración media máxima efectiva
EtOH	Etanol
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos
HMWC	Quitosano de alto peso molecular
IEX	Cromatografía de intercambio iónico
IFNAR	Receptor de interferón de tipo I
IFNs	Interferones
IFN $\alpha$	Interferón alfa
IFN $\alpha$ -2b STD	Interferón alfa 2b de referencia estándar
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
ISGs	Genes estimulados por interferón
LMWC	Quitosano de bajo peso molecular

MHC-I	Sistema mayor de histocompatibilidad clase I
MHC-II	Sistema mayor de histocompatibilidad clase II
MMC	Cromatografía de modo mixto
NK	Células <i>natural killer</i>
NPs	Nanopartículas
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
pDCs	Células dendríticas plasmocitoides
PDI	Índice de polidispersidad
PEG	Polietilenglicol
PLGA	ácido poli(láctico-co-glicólico)
PRRs	Receptores de reconocimiento de patógenos
rhIFN $\alpha$ -2b	Interferón alfa 2b recombinante humano
RLRs	Receptores tipo RIG
SEM	Microscopio electrónico de barrido
STEM	Microscopio electrónico de transmisión y barrido
TLRs	Receptores tipo Toll
VHB	Virus de hepatitis B
VHC	Virus de hepatitis C
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

## Resumen

El interferón alfa (IFN $\alpha$ ) es utilizado en el tratamiento de diversas enfermedades virales y varios tipos de cáncer debido a su actividad antiviral, antiproliferativa e inmunomoduladora. Este fármaco tiene una corta vida media, por lo que se requiere una administración frecuente de altas dosis para alcanzar una respuesta terapéutica óptima, lo que conlleva a la aparición frecuente de efectos secundarios. La encapsulación se ha propuesto como estrategia para aumentar la vida media del IFN $\alpha$ , pues aporta un sistema de liberación controlada y sostenida en el tiempo, dirigido a la reducción de los efectos secundarios del fármaco. En el presente trabajo se obtuvo una formulación que permitió la encapsulación polimérica del IFN $\alpha$ -2b recombinante (rhIFN $\alpha$ -2b) en nanopartículas de quitosano mediante el método de *electrospray*. Se determinó por microscopía electrónica que las nanopartículas sintetizadas conformaron una población heterogénea con diámetros dentro del rango 230-475 nm. Además, se evaluaron los sistemas de liberación de IFN $\alpha$  encapsulados reportados en la literatura, y su relación con la actividad biológica, donde se encontró que la liberación puede obedecer a una cinética en una o dos fases, y que la encapsulación del medicamento no disminuye su actividad biológica. En conclusión, la encapsulación del rhIFN $\alpha$ -2b representa un sistema activo de liberación sostenida que podría escalarse a futuro como una potencial alternativa terapéutica.

Palabras clave:

- **NANOPARTÍCULAS**
- **ELECTROSPRAY**
- **QUITOSANO**
- **CINÉTICA DE LIBERACIÓN**
- **ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

### **Abstract**

Interferon alpha (IFN $\alpha$ ) is used in the treatment of various viral diseases and several types of cancer due to its antiviral, antiproliferative and immunomodulatory activity. This drug has a short half-life, requiring frequent administration of high doses to achieve optimal therapeutic response, which leads to frequent side effects. Encapsulation has been proposed as a strategy to increase the half-life of IFN $\alpha$  by providing a controlled and sustained release system aimed at reducing the side effects of the drug. In the present work, a formulation was obtained that allowed the polymeric encapsulation of recombinant IFN $\alpha$ -2b (rhIFN $\alpha$ -2b) in chitosan nanoparticles using the electrospray method. It was determined by electron microscopy that the synthesised nanoparticles formed a heterogeneous population with diameters in the range 230-475 nm. In addition, the release systems of encapsulated IFN $\alpha$  reported in the literature and their relationship with biological activity were evaluated, where it was found that the release can obey a one- or two-phase kinetics, and that the encapsulation of the drug does not decrease its biological activity. In conclusion, the encapsulation of rhIFN $\alpha$ -2b represents a sustained-release active system that could be scaled up as a potential therapeutic alternative in the future.

Key words:

- **NANOPARTICLES**
- **ELECTROSPRAY**
- **CHITOSAN**
- **RELEASE KINETICS**
- **BIOLOGICAL ACTIVITY**

## Capítulo 1

### Introducción

#### Formulación del problema y antecedentes

Las infecciones virales constituyen una fracción significativa de morbilidad y mortalidad en los seres humanos, lo que ha llevado a una extensa investigación sobre los sistemas de defensa empleados por el huésped para combatir dichas infecciones (Crosse, Monson, Beard, & Helbig, 2018). Los tratamientos más utilizados son los antivirales y las vacunas pero su descubrimiento y desarrollo suele ser complejo y consume mucho tiempo para que salgan al mercado (Mahmoud, 2016). Desde la década de 1960 hasta la fecha se ha evaluado el posible tratamiento de estas infecciones con múltiples antivirales, pero solo una pequeña cantidad ha sido aprobada para su uso clínico (Clercq & Li, 2016). Estos fármacos se utilizan como agentes terapéuticos en el tratamiento de enfermedades causadas por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (Gulick & Flexner, 2019), virus de hepatitis B (VHB) (Razavi-Shearer et al., 2018), virus de hepatitis C (VHC) (Fabrizi, Cerutti, Porata, Messa, & Ridruejo, 2019), citomegalovirus humano (CMVH) (S. J. Chen, Wang, & Chen, 2019), virus de herpes simple (VHS) (Kłysik, Pietraszek, Karewicz, & Nowakowska, 2020), virus de papiloma humano (VPH) (Kardani, Basimi, Fekri, & Bolhassani, 2020), virus sincitial respiratorio (VSR) (Wetzke & Schwerk, 2019), virus varicela zóster (VVZ) (Shiraki, 2018), influenza (Hayden & Shindo, 2019), y coronavirus de tipo 2 (SARS-CoV-2) (Spinner et al., 2020), entre otros, aunque este grupo representa una minoría considerando que se han descubierto más de 200 virus humanos (Clercq & Li, 2016). La búsqueda de nuevos antivirales es constante, ya que muchos medicamentos son discontinuados de su uso clínico debido a su toxicidad, a la evolución de cepas

farmacorresistentes, y a la aparición de virus emergentes y reemergentes, lo que conlleva a pandemias humanas persistentes (Rumlová & Ruml, 2018). Uno de los grupos de moléculas más estudiados como antivirales de amplio espectro han sido los interferones (IFNs), las primeras citoquinas efectoras del sistema inmune innato del huésped (B. X. Wang & Fish, 2019), ya que a través del conocimiento preciso de los mecanismos en los que participa y su actividad biológica es posible desarrollar terapias antivirales seguras y eficaces (A. Park & Iwasaki, 2020).

El interferón alfa (IFN $\alpha$ ) fue aprobado para su uso clínico en 1986 y se utiliza en el tratamiento de varias enfermedades por su acción antiviral directa, y por sus efectos antiproliferativos e inmunomoduladores (Lazear, Schoggins, & Diamond, 2019). Dentro de las afecciones tratadas con IFN $\alpha$  se destacan el sarcoma de Kaposi asociado a SIDA (Lebbe et al., 2019), hepatitis B (Lampertico et al., 2017), hepatitis C (Maughan & Ogbuagu, 2018), condiloma acuminado (Werner, Westfechtel, Dressler, & Nast, 2017), herpes zoster (Castro & Castro, 2014), leucemia de células pilosas (Thompson & Ravandi, 2017), y un amplio espectro de desórdenes oftalmológicos (Lewczuk, Zdebik, & Bogusławska, 2019). El IFN $\alpha$  se administra por diferentes vías de acuerdo con la formulación aplicada y en dependencia de la afección a tratarse (Hopps, Zoon, Djeu, & Petricciani, 1985; Woo, Kwok, & Ahmed, 2017).

Esta molécula tiene una vida media corta de 2-3 horas, y alcanza su aclaramiento luego de la administración parenteral en aproximadamente 16 horas (Kozłowski & Harris, 2001). Por ello, las formulaciones más frecuentes y con administración aprobada son en inyecciones en altas dosis no fisiológicas, requeridas para alcanzar una respuesta terapéutica óptima y evitar el rápido aclaramiento (Younes & Amsden, 2002). La administración de dosis altas tiene como consecuencia la

aparición de efectos adversos como síntomas similares a la gripe (fiebre, escalofríos, dolor de cabeza, náuseas), disfunción hepática y hematológica, depresión, entre otras (Woo et al., 2017; Conlon, Miljkovic, & Waldmann, 2019).

Se han explorado varias estrategias para modificar las formulaciones de IFN $\alpha$  con el fin de que la terapia sea más efectiva y con menor toxicidad (A. Park & Iwasaki, 2020). El conocimiento de la secuencia de ADN y su producción como proteína recombinante abrió la posibilidad de diseñar un interferón consenso alterando la secuencia de IFN $\alpha$  natural. La molécula obtenida a partir de la expresión de este gen es un IFN $\alpha$  recombinante sintético denominado alfacon-1, que contiene en cada posición el aminoácido observado con mayor frecuencia en 13 subtipos no alélicos de IFN $\alpha$  (Alberti, 1999). El alfacon-1 era producido insertando su secuencia de ADN sintético en células de *Escherichia coli*, donde se expresaba y purificaba (Melian & Plosker, 2001), y esta formulación era utilizada en el tratamiento de infecciones por VHB y VHC, en dosis inferiores a las terapias con IFN $\alpha$  libre, hasta que fue discontinuada en 2013 debido a su severa toxicidad (Clercq & Li, 2016). En la actualidad, las formulaciones con IFN $\alpha$  recombinante comercializadas para uso clínico son el Roferon A® (IFN $\alpha$ -2a), Intron A® (IFN $\alpha$ -2b), y sus respectivas presentaciones PEGiladas, descritas a detalle más adelante (Nile et al., 2020).

La conjugación del IFN $\alpha$  con diferentes moléculas también fue investigada con el fin de incrementar el tiempo de vida en la circulación sanguínea del medicamento, es así que se propuso una formulación de IFN $\alpha$  unido con albúmina a la que se denominó Alb-interferón (Jansen & Bruijne, 2012). Los ensayos fase III de esta nueva formulación mostraron que tenía una eficacia equivalente a las terapias disponibles contra VHC crónica (Nelson et al., 2009). Sin embargo, se descubrió que el Alb-interferón producía

alopecia, tos, pérdida de peso, e incluso complicaciones pulmonares, lo que provocaba una frecuente discontinuación de los tratamientos (Zeuzem et al., 2010). Debido al perfil de efectos secundarios de la molécula se desistió en la búsqueda de su aprobación (Jansen & Bruijne, 2012).

La PEGilación consiste en la unión mediante enlaces covalentes de cadenas de poli(etilenglicol) (PEG) al IFN $\alpha$ , emergió como alternativa en vista del fracaso de los otros sistemas propuestos (Kozlowski & Harris, 2001). Esta formulación reduce su excreción a través de los riñones (Asselah et al., 2007), lo que aumenta su vida media aproximadamente diez veces, y da como resultado concentraciones más estables de IFN $\alpha$  en plasma (Trinh, Zobniw, & Hwu, 2017). La farmacocinética mejorada ha permitido reducir el número de inyecciones para el tratamiento de VHB y VHC crónicas, resultando en un régimen más cómodo para el paciente (Woo et al., 2017). Existen dos presentaciones de PEG-IFN $\alpha$  en la actualidad: PEG-IFN $\alpha$ -2a (Pegasys®) y PEG-IFN $\alpha$ -2b (PegIntron®). La primera está constituida por una molécula de IFN $\alpha$ -2a unida de forma covalente a una cadena ramificada de PEG de 40 kDa, mientras que la segunda está formada por una molécula de IFN $\alpha$ -2b acoplada con una cadena lineal de PEG de 12 kDa (Jansen & Bruijne, 2012).

No obstante para estas formulaciones persisten algunas dificultades, pues la PEGilación ocasiona pérdida en la actividad del IFN $\alpha$ , y un aumento en las dosis administradas (Foster, 2010). Podemos concluir que la actividad del PEG-IFN $\alpha$ -2b y del PEG-IFN $\alpha$ -2a es de apenas 28% y 2%, respectivamente, comparadas con la del IFN $\alpha$  nativo (Boulestin et al., 2006). También se presentan eventos adversos, siendo los más comunes escalofríos, fatiga, náusea, dolor de cabeza, anemia, trombocitopenia, síntomas similares a la gripe, dolor en músculos y articulaciones, y reacciones

cutáneas; incluso se han reportado eventos más graves como complicaciones tromboembólicas y sangrado gastrointestinal (Meller et al., 2015). Debido a estas dificultades, los tratamientos con estas moléculas deben ser discontinuados (Bewersdorf et al., 2020). La toxicidad asociada a los IFN $\alpha$  PEGilados ha relegado su terapia a un estado de segunda línea en la mayoría de los países desarrollados, es por ello que aún se requiere desarrollar formulaciones utilizando estrategias alternativas que permitan aumentar la estabilidad y reducir la toxicidad y el aclaramiento del IFN $\alpha$  sin comprometer su actividad biológica (Lazear et al., 2019).

El diseño y la fabricación de nuevos sistemas de suministro de medicamentos pudiera constituir una alternativa eficaz para que esta molécula desarrolle una mayor eficacia y seguridad terapéutica (C. Li et al., 2019). Uno de los sistemas que se han destacado en los últimos años es la encapsulación de diversos fármacos que presentan dificultades en su aplicación, lo que permite mejorar su índice terapéutico y reducir los eventos adversos asociados al tratamiento (Lembo, Donalisio, Civra, Argenziano, & Cavalli, 2018). El perfeccionamiento del índice terapéutico del IFN $\alpha$  a través de este sistema se efectúa al aumentar su actividad farmacológica (X. Ye, Wang, & Wang, 2019). Por otro lado, varios de los efectos secundarios producidos por el IFN $\alpha$ , como los síntomas similares a la gripe o la depresión, parecen estar relacionados con la velocidad a la que se alcanza el pico de concentración sérica de la molécula, de manera que una formulación de IFN $\alpha$  con un aumento de concentración progresivo sin generar un pico rápido podría tener menos efectos secundarios (Jansen & Bruijne, 2012). En este contexto, la encapsulación de la molécula es una alternativa que brinda la posibilidad de que la liberación sea controlada, para evitar un pico de concentración sérica en un período de tiempo corto (Saez, Ramón, Peniche, & Hardy, 2012).

La encapsulación del IFN $\alpha$  ha sido evaluada en diversos estudios, entre los cuales se puede destacar el desarrollo de microesferas de polímero Poly-Active® (77% de tereftalato de PEG y 23% tereftalato de polibutileno) cargadas con IFN $\alpha$ -2b denominadas Locteron® (Lawitz et al., 2010), nanopartículas (NPs) metálicas cubiertas de lisina (Aghdam, Vossoughi, Almazdeh, & Zeinali, 2008) o acopladas a ácido hialurónico (M. Y. Lee et al., 2012), microagujas de sulfato de condroitina y polivinilpirrolidona (PVP) (J. Chen, Qiu, Zhang, & Gao, 2016), liposomas PEGilados (Jørholm, Basnet, Acharya, & Škalko-Basnet, 2017), NPs de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) (Saez, Ramón, Aldana, Pérez, & Hardy, 2008), NPs de PLGA/poloxámero (Sánchez, Tobío, González, Fabra, & Alonso, 2003), y NPs de quitosano (CS) (Imperiale, Schlachet, Lewicki, Sosnik, & Biglione, 2019).

### **Justificación del problema**

Mediante la encapsulación es posible la administración de fármacos y proteínas terapéuticas maximizando su potencial, ya que este método brinda una matriz de transporte que evita la influencia de interacciones débiles no covalentes (fuerzas de van der Waals e interacciones electrostáticas) que pueden alterar la estabilidad de la proteína (Almeida & Souto, 2007). Además, el sistema protege a las proteínas de la degradación por enzimas que se encuentran en el sitio de administración o durante el transporte al sitio de acción, aumentando de esta manera su vida media (C. Ye & Chi, 2018). Hasta la fecha existen dos formulaciones encapsuladas aprobadas por la Administración de Medicamentos y Alimentos de Estados Unidos (FDA): el Abraxane® (ABI-007) y el Genexol®, constituidas por moléculas de paclitaxel, unidas a NPs de albúmina, o encapsuladas en micelios de PEG-ácido poliláctico, respectivamente,

utilizadas en el tratamiento de cáncer de mama y cáncer de pulmón de células no pequeñas (Pérez-Herrero & Fernández-Medarde, 2015; Li et al., 2019).

Los primeros reportes de encapsulación de IFN $\alpha$  datan de la década de 1980, en los que se utilizaron liposomas con el fin de aumentar la actividad antiproliferativa de la molécula contra líneas celulares de tumores de próstata humanos (Eppstein & Stewart, 1981; Killion et al., 1989). La técnica se fue sofisticando de manera que el IFN $\alpha$  logró ser encapsulado en liposomas multilamelares sin alterar su actividad antiviral y antiproliferativa (Killion, Fishbeck, Bar-Eli, & Chernajovsky, 1994). Sin embargo, estos estudios no realizaron la caracterización de las estructuras, no mencionan si se trató de una micro o nanoencapsulación, y tampoco poseen investigaciones adicionales que permitiesen a las formulaciones tener una aplicación clínica (Eppstein & Stewart, 1981; Killion et al., 1989, 1994).

Durante años se exploró la microencapsulación como estrategia para transportar el IFN $\alpha$  (Saez et al., 2008; F. Yang et al., 2010). La investigación de estos sistemas permitió el desarrollo del Locteron®, una microformulación enfocada al tratamiento de hepatitis C (Leede et al., 2008). Los ensayos clínicos fase IIB de este producto mostraron que tenía una eficacia antiviral similar al PEG-IFN $\alpha$ -2b, sus niveles mínimos en suero eran superiores, y provocaba menos efectos secundarios como los síntomas similares a la gripe (Lawitz et al., 2010). También se encontró que provocaba neutropenia, comparable con la reportada para PEG-IFN $\alpha$ 2a (Jansen & Bruijne, 2012). No existe registro de algún ensayo clínico fase III en los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos (NIH), ni de aprobación de la FDA para su uso terapéutico (Vermehren & Sarrazin, 2011).

Más adelante se describieron las principales desventajas de las microencapsulaciones en general: la liberación incompleta del fármaco y la inestabilidad que el proceso ocasiona en la molécula de IFN $\alpha$  (Saez et al., 2012). Por ello se ha evaluado la posibilidad de encapsular el fármaco en NPs, ya que los índices terapéuticos de antivirales pueden mejorarse con nanoformulaciones, en especial para aquellos como el IFN $\alpha$  que requieren de administraciones frecuentes de altas dosis por su corta vida media (Lembo & Cavalli, 2010; Li et al., 2019). Las NPs permiten una cinética de liberación sostenida del fármaco encapsulado, mayor biodisponibilidad, farmacocinética modificada y efectos secundarios reducidos (Lembo et al., 2018). Son varios los sistemas de nanotransporte evaluados para agentes antivirales, entre los que se incluyen liposomas, NPs metálicas, poliméricas, lipídicas e híbridas, dendrímeros, nanoemulsiones, sistemas micelares y nanoestructuras auto ensambladas (Zazo, Colino, & Lanao, 2016). En el desarrollo de estas plataformas se deben considerar criterios de seguridad, biocompatibilidad, biodegradabilidad y compatibilidad del material encapsulante con el fármaco, así como los parámetros que determinan la funcionalidad de una nanopartícula como su tamaño, forma y características de superficie (Dufort, Sancey, & Coll, 2012). Por otro lado, la eficacia, seguridad, y cuestiones de manufactura deben evaluarse de forma cuidadosa para llevar este enfoque hacia la aplicación clínica (Lembo et al., 2018).

Dentro de los diferentes métodos de nanoencapsulación, la encapsulación polimérica representa una alternativa prometedora que ha demostrado una eficacia mejorada, liberación dirigida y sostenida del fármaco, reducción en la cantidad de principio activo, reducción de eventos adversos, y de la degradación metabólica del medicamento (Sridhar & Ramakrishna, 2013). Las NPs poliméricas corresponden a una

tecnología posterior a los liposomas, con mayor estabilidad en condiciones de almacenamiento y en fluidos biológicos, y mejor capacidad de carga de fármacos (Zazo et al., 2016). El resultado de esta encapsulación da lugar a partículas sólidas coloidales conformadas por una matriz biocompatible compuesta por alguno de los siguientes polímeros, que pueden ser naturales, semisintéticos o sintéticos: polilactidas (PLAs) (Ghasemi et al., 2018) y copolímeros de polilactida-políglucólido (Andima et al., 2018), policaprolactonas (PCLs) y poliácridatos (PCAs) (Dadkhah Tehrani & Parsamanesh, 2017), polimetacrilatos (PMMAs) (Vianey et al., 2017), polivinilalcohol (PVA) (Saghir et al., 2019), PEG (Almoustafa, Alshawsh, & Chik, 2017), alginato (Severino et al., 2019), derivados de celulosa (Dai & Si, 2018), y CS (Luque-Alcaraz, Lizardi-Mendoza, Goycoolea, Higuera-Ciapara, & Argüelles-Monal, 2016). Todos estos materiales están aprobados por la FDA y otras autoridades regulatorias a nivel mundial para su uso médico (das Neves, Nunes, Machado, & Sarmento, 2015). El polímero utilizado en la encapsulación influye en la liberación de la molécula de acuerdo con sus características, ya que cada material interacciona de distinta forma con la proteína (J. Wu, Wang, Yang, Liu, & Lu, 2017).

El CS es un polisacárido biológico catiónico y semisintético derivado de la quitina, y uno de los polímeros más usados en la ciencia biomédica por su gran cantidad de potenciales aplicaciones (Sheng et al., 2015; A. Kumar, Vimal, & Kumar, 2016). En el transporte de fármacos, tiene varias ventajas sobre otros polímeros por su menor toxicidad, mayor biocompatibilidad, capacidad mucoadhesiva, estabilidad, propiedades antibacterianas, aumento en el índice terapéutico del medicamento, y por otra parte, evita la dosificación frecuente y costosa (Garg, Chauhan, Nagaich, & Jain, 2019). Las NPs de CS (CS-NPs) además tienen estabilidad térmica y buenas

propiedades mecánicas (Ali & Ahmed, 2018). Es por ello que se ha investigado el uso de CS-NPs para el transporte de dextrano-doxorrubicina (Mitra, Gaur, Ghosh, & Maitra, 2001), doxorrubicina (Janes, Fresneau, Marazuela, Fabra, & Alonso, 2001; Sanyakamdhorn, Agudelo, & Tajmir-Riahi, 2013), proteínas y ARN corto de interferencia (siRNA) (Katas, Raja, & Lam, 2013), paclitaxel (Kwon, 2008), y antígenos (Prego et al., 2010).

Las CS-NPs se pueden sintetizar por los métodos de complejo de polielectrolitos, gelificación ionotrópica (Pant & Negi, 2018), evaporación de solvente/co-precipitación (Khdair et al., 2016), emulsificación (Sorasitthyanukarn, Muangnoi, Ratnatilaka Na Bhuket, Rojsitthisak, & Rojsitthisak, 2018), coacervación compleja (Hamdi, Nasri, Li, & Nasri, 2020), difusión del solvente de emulsificación (Naskar, Koutsu, & Sharma, 2019), y *electrospray* (Abyadeh, Akbar, Zarchi, Faramarzi, & Amani, 2017). Esta última técnica tiene varias ventajas sobre las otras: el proceso puede realizarse en condiciones ambientales (temperatura y presión) lo que resulta beneficioso para biomoléculas sensibles e incluso para células vivas (Jiamian Wang, Jansen, & Yang, 2019); la eficacia de encapsulación puede maximizarse al no existir un medio externo que permita la disolución o migración de las cargas solubles en agua (Sosnik, 2014); se pueden obtener nano y micropartículas cargadas con fármacos con una distribución de tamaño estrecha (Enayati, Chang, Bragman, Edirisinghe, & Stride, 2011); la repulsión coulombica entre las gotas con carga eléctrica provoca una auto-dispersión sin coalescencia de las partículas (Y. Xu & Hanna, 2006); se pueden obtener diferentes estructuras a través del ajuste de los factores de solución y parámetros de procesamiento (Jiamian Wang et al., 2019).

Por todo lo anterior proponemos la presente investigación que desarrollará un proceso de encapsulación de IFN $\alpha$  en nanopartículas de CS mediante la técnica de *electrospray*. La síntesis de partículas utilizando este método permitirá la obtención de una población de NPs a través de un proceso realizado a temperatura ambiente. La nanoformulación propuesta representa una potencial alternativa en el tratamiento antiviral, que con estudios preclínicos y clínicos exitosos, podría reemplazar a las terapias con IFN $\alpha$  disponibles en la actualidad, pues se trata de un sistema de transporte de la molécula que puede ser administrado de forma local, y permitiría la liberación sostenida en el tiempo de la molécula, reduciendo así las dosis necesarias para conseguir una respuesta terapéutica, y con ello la posible toxicidad y rápido aclaramiento que tienen las terapias actuales. Evaluaremos además los sistemas de liberación de IFN $\alpha$  encapsulado, y la relación que dicha cinética tiene con la actividad biológica de la molécula, con el fin de reafirmar la potencialidad clínica que posee la nanoformulación a desarrollar en este estudio.

### **Objetivos de la Investigación**

#### ***Objetivo General***

Obtener una novedosa formulación que permita la nanoencapsulación de interferón alfa 2b recombinante humano (rhIFN $\alpha$ -2b).

#### ***Objetivos Específicos***

1. Evaluar una formulación que permita nanoencapsular el rhIFN $\alpha$ -2b.
2. Analizar los sistemas de liberación del rhIFN $\alpha$ -2b reportados en la literatura, y su relación con la actividad biológica.

## Capítulo 2

### Marco teórico

#### Proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes son aquellas obtenidas a través de la tecnología de ADN recombinante, y consiste en la identificación, corte e inserción de genes del genoma de otro organismo, utilizando tres herramientas principales: enzimas (de restricción, polimerasas y ligasas), vectores, y un organismo huésped (Ferrer-Miralles, Saccardo, Corchero, Xu, & García-Fruitós, 2015). Para el año 2018, más de 130 proteínas recombinantes estaban aprobadas por la FDA para uso clínico, aunque a nivel mundial se producían y utilizaban en medicina más de 170 productos de esta naturaleza (Pham, 2018). En el 2019 se aprobaron 35 biofarmacéuticos, de los cuales 28 (80%) son recombinantes (Rader, 2020). Estas moléculas han tenido diversos usos clínicos como hormonas, interferones, interleucinas, factores de crecimiento, factores de crecimiento tumoral, factores de coagulación sanguínea, fármacos trombolíticos, y enzimas para tratar enfermedades crónicas (Pham, 2018).

Para la obtención de las proteínas recombinantes se han utilizado varios sistemas de expresión incluyendo bacterias, levaduras, células de insecto, hongos filamentosos, microalgas, células de mamífero, animales transgénicos y organismos vegetales (Felberbaum, 2015; Bandehagh, Khodadadi, & Noparvar, 2016; Owczarek, Gerszberg, & Hnatuszko-Konka, 2019). La selección del sistema de expresión óptimo, así como las condiciones de crecimiento más apropiadas, deben determinarse de acuerdo con las características de la proteína y los requerimientos de los procesos *upstream* y *downstream* (Mogk, Mayer, & Deuerling, 2002). El sistema de expresión

bacteriano y dentro de este *E. coli*, es el sistema más utilizado debido a su facilidad de manejo, costo reducido, alto rendimiento, y la posibilidad de optimizar los procesos de producción y purificación mediante procedimientos de escalado asequibles (Lobstein et al., 2012), Existen varias cepas disponibles de este organismo (Ferrer-Miralles et al., 2015), sin embargo, *E. coli* posee fuertes restricciones, para la expresión de proteínas de mamíferos de longitud completa y que requieren modificaciones post-traduccionales propias de los organismos eucariotas, como la glicosilación, formación de puentes disulfuro, fosforilación o procesamiento proteolítico, que pueden estar relacionadas con la solubilidad de la proteína o con su actividad biológica, y la agregación de la proteína expresada que complica o imposibilita la purificación (Freigassner, Pichler, & Glieder, 2009; Ferrer-Miralles et al., 2015; Owczarek et al., 2019). En la actualidad estas dificultades se han superado sin necesidad de cambiar el sistema de expresión, ya que se pueden utilizar cepas genéticamente modificadas para obtener una producción eficiente de proteínas recombinantes solubles en la bacteria (Nasiri et al., 2017).

### **Interferones (IFNs)**

Uno de los grupos de proteínas recombinantes más estudiados y que mayor interés clínico han recibido desde su descubrimiento en 1957 son los interferones (IFNs), debido a su capacidad protectora contra virus patogénicos, sus propiedades antitumorales e inmunorreguladoras (Pestka, Krause, & Walter, 2004; Sprooten, Agostinis, & Garg, 2019; A. Park & Iwasaki, 2020). La primera molécula purificada y obtenida de forma recombinante fue el IFN $\alpha$ . De hecho, la purificación y evaluación de la actividad antiviral de los diferentes subtipos de IFN $\alpha$  permitió determinar, a través de estudios en células de leucemia mieloide crónica humana (AG-1732), que cada especie de IFN exhibe un perfil de actividad distinto (Pestka et al., 2004).

La aprobación del IFN $\alpha$  por la FDA para su uso terapéutico en 1986 contra el sarcoma de Kaposi y la leucemia de células pilosas allanó el camino para el desarrollo clínico de otros IFNs terapéuticos (Pestka et al., 2004), que se fabrican utilizando la tecnología de ADN recombinante, y son múltiples los aprobados para su uso clínico: IFN $\alpha$ -2a (Roferon A®), IFN $\alpha$ -2b (Intron A®), IFN $\alpha$ -n1 (Wellferon®), IFN $\alpha$ -n3 (Alferon®), IFN $\beta$ -1a (Rebif®), IFN $\beta$ -1b (Betaferon®), IFN $\beta$ -1a (Avonex®), IFN $\beta$ -1b (Betaseron®), PEG-IFN $\alpha$ -2a (Pegasys®), PEG-IFN $\alpha$ -2b (PegIntron®), monometoxi-PEG-IFN $\alpha$ -2b (Sylatron®), e IFN $\gamma$ -1b (Acimmune®) (Nile et al., 2020). El IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  e IFN $\gamma$  pueden expresarse en *E. coli*, ya que las formas no glicosiladas obtenidas mediante este sistema tienen una actividad biológica similar que sus contrapartes naturales glicosiladas, por lo que son igual de efectivas (Dingermann, 2008).

Para la expresión recombinante se ha utilizado la cepa *SHuffle<sup>TM</sup> T7 Express*, en la que la proteína no forma cuerpos de inclusión al plegarse de forma adecuada, es decir se produce en su forma activa (Safarpour et al., 2017). En esta cepa la expresión de tioredoxin reductasa (*trxB*) y glutatión reductasa (*gor*) están suprimidas para permitir la formación de puentes disulfuro estables, y la expresión de DsbC citoplasmática se encuentra activa para catalizar la formación e isomerización de dichos puentes y actúa como chaperona en el plegamiento que no requiere puentes disulfuro (Nasiri et al., 2017).

Los IFNs son citoquinas que inducen una resistencia no específica a infecciones virales a través de diversos mecanismos, incluyendo la inhibición de síntesis de proteínas, inactivación de ARN viral, y amplificación de los mecanismos fagocíticos y citotóxicos (Schoggins, 2019). Fueron descubiertas en 1957 por Isaacs y Lindenmann, cuando observaron que células embrionarias de pollo infectadas con virus de influenza

producían una molécula capaz de inducir resistencia a infecciones virales (J. Isaacs, 1957). Las respuestas biológicas a los IFNs se inician con la unión de estas moléculas a sus receptores específicos de la membrana celular, con la subsecuente señalización de la vía JAK/STAT que activa los factores de transcripción de IFN, los cuales se translocan al núcleo y se unen a promotores que inducen la expresión de genes inducibles por IFN (Au-Yeung & Horvath, 2018). Además de su actividad antiviral, los IFNs tienen actividad inhibidora de la proliferación celular, inmunomoduladora, anticancerígena y antifibrolítica (Meager, 2002).

Existen tres tipos de IFN: tipo I ( $\alpha/\beta$ ), tipo II ( $\gamma$ ) y tipo III ( $\lambda$ ), que se definen por sus diferencias en las secuencias aminoacídicas, propiedades fisicoquímicas, e inducción por diferentes agentes de distintos tipos celulares (Negishi, Taniguchi, & Yanai, 2018). Los agentes inductores pueden ser virus, bacterias, productos bacterianos, polímeros, compuestos de bajo peso molecular, y antígenos o mitógenos (Muñoz-Carrillo et al., 2019). Los IFN de tipo I son una familia multigénica que codifica en humanos 13 subtipos de IFN $\alpha$ , uno de IFN $\beta$ , y otros productos génicos apenas descritos (IFN- $\epsilon$ , IFN- $\tau$ , IFN- $\kappa$ , IFN- $\omega$ , IFN- $\delta$  e IFN- $\zeta$ ) (Pestka et al., 2004). El IFN- $\gamma$  es el único producto génico agrupado en la familia IFN de tipo II, en su mayoría es producido por células T y NK, y puede actuar en un amplio rango de células que expresen su receptor (Schoenborn & Wilson, 2007). El tercer tipo, IFN de tipo III, es el último descrito, y está compuesto por IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\lambda$ 2, IFN- $\lambda$ 3 e IFN- $\lambda$ 4, que tienen funciones similares a las citoquinas de la familia IFN tipo I, pero con actividad restringida, pues la expresión de su receptor está limitado a células epiteliales (Witte, Witte, Sabat, & Wolk, 2010). De hecho, las células inmunes son insensibles a IFN- $\lambda$  (Durbin, Kotenko, & Durbin, 2013).

## Interferones de tipo I

Los IFNs de tipo I son una familia multigénica de citoquinas pleiotrópicas que son estimuladas durante infecciones virales, y que en humanos consiste en 13 subtipos de IFN $\alpha$ , un subtipo de IFN $\beta$ , IFN $\epsilon$ , IFN $\kappa$  e IFN $\omega$  (Sutter, Dickow, & Dittmer, 2018). Estos polipéptidos son secretados por células infectadas y tienen tres funciones principales: (1) inducir estados antimicrobianos intrínsecos a las células en células infectadas y vecinas que limitan la propagación de agentes infecciosos, en particular patógenos virales; (2) modular las respuestas inmunitarias innatas de una manera equilibrada que promueve la presentación de antígenos y las funciones de las células asesinas naturales al tiempo que restringen las vías proinflamatorias y la producción de citocinas; (3) activar el sistema inmunitario adaptativo, promoviendo así el desarrollo de respuestas de células T y B específicas de antígeno de alta afinidad y memoria inmunológica (Ivashkiv & Donlin, 2014).

La inducción de los IFNs de tipo I en las células infectadas inicia con el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), en este caso estructuras específicas presentes en estas células infectadas por virus, a través de los receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs), que a su vez provocan la regulación positiva de los genes de IFNs de tipo I (Kindler, Thiel, & Weber, 2016). Todas las células nucleadas tienen la capacidad de responder a estos IFNs ya que expresan el receptor de IFN en su superficie, que está compuesto por dos subunidades (IFNAR-1 e IFNAR-2) (Bekisz, Schmeisser, Hernandez, Goldman, & Zoon, 2004). La unión de los IFNs de tipo I con su receptor activa la vía JAK-STAT, en la cual las quinasas Janus JAK1 y TYK2 son activadas en el dominio citoplásmico de IFNAR-2 y 1, respectivamente. Las quinasas activadas luego fosforilan los transductores de señal y

factores de transcripción STAT1 y STAT2, que se unen con IRF9 para formar el complejo ISGF3 que ingresa al núcleo para activar los promotores de un programa de expresión génica antiviral. Los genes específicos que están regulados de forma positiva por los IFN se denominan en colectivo genes estimulados por IFN (ISGs) (Kindler et al., 2016).

### **Interferón alfa (IFN $\alpha$ )**

El IFN $\alpha$  es una molécula de 19 kDa que tiene 13 subtipos no alélicos en humanos, todos codificados por genes IFNA ubicados en el brazo corto del cromosoma 9 (Sutter et al., 2018). Es capaz de inducir un estado antiviral tanto en células infectadas como en no infectadas, activando un programa de transcripción génica que interfiere con múltiples etapas del ciclo de replicación viral, a través de varios mecanismos (Yan & Chen, 2012). También desempeña funciones adicionales que influyen la respuesta inmune innata y adaptativa desencadenada por bacterias y otros patógenos. El desencadenamiento de las diferentes vías de señalización, luego de la unión del IFN $\alpha$  con el receptor de interferón de tipo I (IFNAR), es dependiente del contexto bajo el cual se produjo. Esto influencia ISGs son activados o reprimidos, lo que puede conllevar a una respuesta beneficiosa o perjudicial para el huésped (McNab, Mayer-Barber, Sher, Wack, & O'Garra, 2015).

Casi todas las células en el cuerpo pueden producir IFN $\alpha$ , aunque son las células dendríticas (DCs) plasmocitoides las que producen grandes cantidades, como respuesta a la estimulación de los PRRs, por parte de productos microbianos (Paludan & Bowie, 2013). Estos receptores se encuentran en la superficie celular, en el citosol o en endosomas, y reconocen ácidos nucleicos extraños y ADN propio en el citosol, así como un número limitado de PAMPs (McNab et al., 2015). Los PAMPs virales son a

menudo características moleculares que no se encuentran en las células huésped, como estructuras de ácido nucleico propias de genomas virales, o intermediarios de replicación (Iwasaki, 2012). El ADN o ARN viral es reconocido sobre todo en compartimentos endosomales o citosólicos por dos clases de PRRs, los receptores tipo Toll (TLRs), y los receptores tipo RIG-I (RLRs), respectivamente. Mientras la mayoría de las células huésped tienen RLRs citosólicos, los TLRs son expresados por lo regular en células inmunes innatas (Schoggins & Rice, 2011). Además, la estimulación de genes de IFN $\alpha$  puede ser inducida por la proteína adaptadora STING (Negishi et al., 2012).

### ***Subtipos de IFN $\alpha$***

Los 13 subtipos de IFN $\alpha$ ,  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 4,  $\alpha$ 5,  $\alpha$ 6,  $\alpha$ 7,  $\alpha$ 8,  $\alpha$ 10,  $\alpha$ 13,  $\alpha$ 14,  $\alpha$ 16,  $\alpha$ 17, y  $\alpha$ 21, son codificados por los genes IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, IFNA6, IFNA7, IFNA8, IFNA10, IFNA13, IFNA14, IFNA16, IFNA17 e IFNA21, respectivamente (Lazear et al., 2019). Es posible que se hayan desarrollado por conversión y duplicación génica a partir de un gen similar a IFNA ancestral (L. Xu, Yang, & Liu, 2013). Todos los subtipos de IFN $\alpha$  tienen similitudes en la estructura, como en la falta de intrones o la longitud de la proteína (161-167 aminoácidos), y sus secuencias de proteínas están muy conservadas (75-99% de identidad de secuencia de aminoácidos) (Hardy, Owczarek, Jermini, Ejdebäck, & Hertzog, 2004). Se unen al mismo receptor de IFN $\alpha/\beta$ , sin embargo, la afinidad de unión a ambas subunidades del receptor difiere entre los subtipos (Lavoie et al., 2011). Por ejemplo, la afinidad del IFN $\alpha$ -1 humano por el IFNAR2 es mucho menor en comparación con todos los demás subtipos (40–550 veces menor) (Lazear et al., 2019).

La activación de diferentes cascadas de señalización corriente abajo, incluida la fosforilación de distintas moléculas STAT y proteína activada por mitógenos (MAP)

quinasas, puede ocurrir de una manera específica de subtipo (Cull, Tilbrook, Bartlett, Brekalo, & James, 2003). Por lo tanto, existe una creciente evidencia de que las diferentes afinidades de unión, las especificidades del tipo de célula, el microambiente, la avidéz del receptor, el tiempo y el ajuste fino de los eventos de señalización posteriores pueden modular la respuesta a los subtipos de IFN $\alpha$  individuales (Tomasello, Pollet, Vu Manh, Uzé, & Dalod, 2014). También se ha encontrado que las actividades antivirales e inmunomoduladoras son diferentes para cada subtipo en distintas infecciones virales (Gibbert et al., 2012; Song et al., 2017; Sutter et al., 2018).

### ***Señalización y activación de la expresión de IFN $\alpha$***

Los TLRs que activan la producción de IFN $\alpha$  son TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 y TLR9 (A. Park & Iwasaki, 2020). Éstos se encuentran localizados en endosomas, o en la superficie celular. Por ejemplo, TLR3 y TLR8 son endosómicos y reconocen ARN de doble cadena (ARNbc) derivado de virus o ARN propio derivado de células muertas (Rudd et al., 2006), y ARN de cadena sencilla (ARNmc) (A. Park & Iwasaki, 2020), respectivamente. Por su parte, TLR4 se expresa en la superficie celular y reconoce una variedad de PAMPs bacterianos, patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) (Andersson & Tracey, 2011), y glicoproteínas virales (Kurt-Jones et al., 2000). Al unirse al ligando, los TLRs reclutan proteínas adaptadoras como la proteína 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide (MyD88) y/o el adaptador que contiene el dominio Toll/receptor de interleucina-1 (TIR), incluido IFN- $\beta$  (TRIF) para activar las proteínas IRF y otros factores de transcripción. TLR3 y TLR4 inducen la expresión génica de IFN $\alpha$  a través de la señalización por TRIF-TANK (Negishi et al., 2012), mientras que TLR8 estimula la expresión señalizando por MyD88 (A. Park & Iwasaki, 2020). Tras el reconocimiento de sus ligandos, TRIF se fosforila y recluta moléculas de señalización

*downstream* como TRAF3, NAP1 y TBK1, lo que resulta en la fosforilación, dimerización y translocación nuclear del factor regulador de interferón 3 (IRF3) (figura 1) (Oganesyan et al., 2006). Tanto IRF3 como IRF7 son claves en la inducción de IFN $\alpha$  dependiente de TLR3 (Negishi et al., 2012).

Las DCs plasmocitoides (pDCs) son un subconjunto de células mieloides que expresan altas cantidades de TLR7 y TLR9, y secretan niveles muy altos de IFN $\alpha$  (Colonna, Trinchieri, & Liu, 2004). TLR7 y TLR9 reconocen ARNmc y ADN con oligonucleótidos CpG no metilados, respectivamente, para inducir fuertes respuestas de IFN $\alpha$  (Kawai & Akira, 2006). La inducción de genes de IFN $\alpha$  activada por TLR7 y TLR9 es dependiente de MyD88, y reclutan solo IRF7 (figura 1) (Kawai et al., 2004). Para estos dos receptores, MyD88 también recluta la proteína adaptadora TRAF6, y la quinasa asociada al receptor de interleucina (IRAK) 1 e IRAK4, que son transductores de señal requeridos para la inducción del IFN $\alpha$  (Kawai & Akira, 2006). La activación de las quinasas IRAK estimulan cascadas de otras quinasas, entre ellas el inhibidor de quinasa NF- $\kappa$ B (IKK) $\alpha$ , que es esencial para la activación de IRF7 (Hoshino et al., 2006).

Las helicasas de ARN, RIG-I, y el gen 5 asociado a la diferenciación de melanoma (MDA5), son receptores citosólicos esenciales para la detección de ARN, en particular ARN 5'-trifosfato sin *capping* y ARNbc (Kato et al., 2006). Ambas helicasas contienen un dominio helicasa de ARN responsable de la detección de ARN viral, así como dos dominios de activación y reclutamiento de caspasa amino-terminales (CARD) que activan vías de señalización *downstream* (Yoneyama et al., 2005). La molécula adaptadora que vincula la detección de ARN viral por RIG-I o MDA5 con la señalización posterior es la proteína de señalización antiviral mitocondrial (MAVS) (figura 1) (Tamura, Yanai, Savitsky, & Taniguchi, 2008). MAVS contiene un dominio CARD amino-terminal

que media las interacciones CARD-CARD con los dominios CARD de RIG-I y MDA5 para transmitir la señalización *downstream*. MAVS transmite señales de RIG-I y MDA5 a la quinasa de unión a TANK 1 (TBK1) e IKK $\epsilon$  que fosforilan IRF3 e IRF7 (Sun et al., 2006). En un inicio, IRF3 e IRF7 residen en formas latentes en el citosol de las células no infectadas. Tras la infección por virus, TBK1 activada por RIG-I o MDA5 fosforila IRF3, lo que bloquea la autoinhibición y permite la translocación nuclear de IRF3 y la interacción con su coactivador CBP (Tamura et al., 2008). Luego, CBP facilita la fosforilación de Ser385 o Ser386, lo que permite la dimerización de IRF3 (Panne, McWhirter, Maniatis, & Harrison, 2007). Se presume que ocurre un mecanismo similar que involucra a IRF7. Como resultado, se forma en el núcleo un holocomplejo que contiene IRF3 e IRF7 dimerizados, ya sea como homodímero o heterodímero, y coactivadores como CBP o p300. Este holocomplejo se une a las secuencias de ADN de elementos de respuesta sensibles a IFN (ISRE) diana dentro de los promotores de los genes de IFN $\alpha$  (Honda, Takaoka, & Taniguchi, 2006).

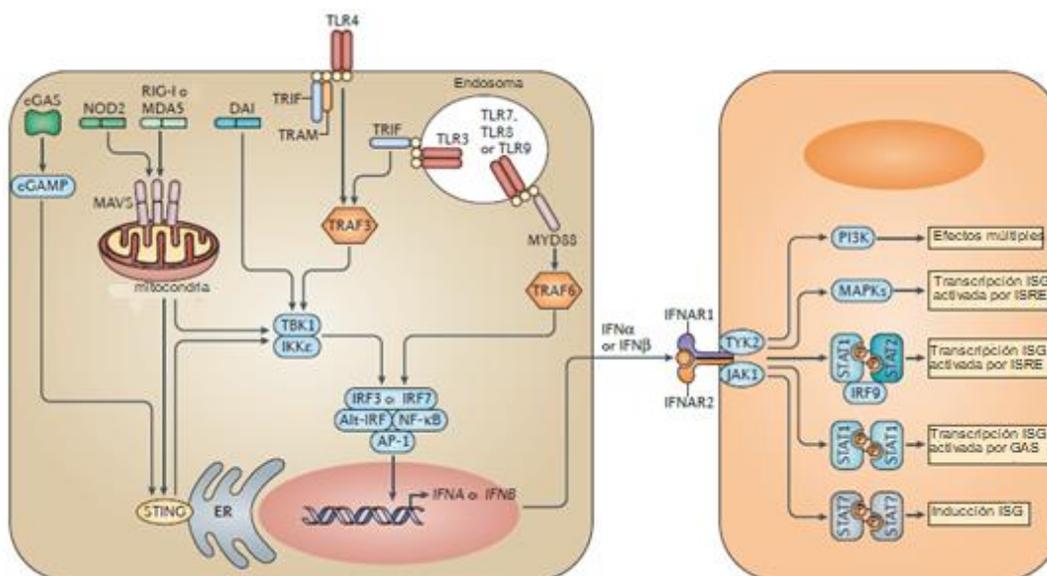
El ADN de doble cadena (ADNdc) también puede activar la expresión de IFN $\alpha$ , a través de los receptores cGAS, IFI16, DDX41 y DAI. La proteína adaptadora del estimulador de genes IFN (STING) en la membrana del retículo endoplásmico envía señales *downstream* de estos receptores, y proporciona un andamio para el reclutamiento de TBK1, que fosforila IRF3 que conduce a la activación de la expresión del gen de IFN $\alpha$  (figura 1) (Negishi et al., 2018).

El IFN $\alpha$  se une a un receptor transmembrana heterodimérico compuesto de las subunidades IFNAR1 e IFNAR2 (figura 1). Esta unión activa las proteínas JAK1 y TYK2, que fosforilan los transductores de señal y activadores de transcripción 1 y 2 (STAT1 y STAT2) citosólicos, llevando a la dimerización, translocación nuclear y unión de estas

moléculas a IRF9 para formar el complejo factor ISG 3 (ISGF3) (McNab et al., 2015). Este complejo se une a los elementos de respuesta estimulados por IFN en los promotores de ISG para activar la transcripción de ISG (Ivashkiv & Donlin, 2014). De esta manera, el IFN $\alpha$  induce la expresión de más de 300 ISGs, incluso podrían superar el millar, que provocan a su vez un estado celular antiviral (Schoggins, 2019). La señalización a través de STAT puede realizarse con vías asociadas a otras citoquinas, incluyendo STAT3, STAT4, STAT5A y STAT5B. Las vías fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), diana de rapamicina de mamífero, y la quinasa activada por mitógenos múltiples (MAPK) pueden activarse corriente debajo de IFNAR (McNab et al., 2015). La diversidad de las vías de señalización podría en parte explicar los amplios efectos mediados por IFN $\alpha$ , ya que permite la transcripción de un rango extenso de genes aparte de aquellos dedicados a la restricción viral (Ivashkiv & Donlin, 2014). Resulta notable que alrededor el 10% de los genes en el genoma humano tienen el potencial para ser regulados por IFNs (Schoggins, 2019). Entre ellos se incluyen genes que codifican citoquinas y quimiocinas, efectores antibacteriales, moléculas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas, y moléculas involucradas en procesos metabólicos (Rauch, Müller, & Decker, 2013).

## Figura 1

*Rutas de inducción de IFNs tipo I y señalización del receptor.*



Nota. Fuente: McNab et al. (2015).

### **Actividad antiviral del IFN $\alpha$**

Dentro de los productos generados por los ISGs se han identificado varias proteínas que cumplen un rol importante en la supresión de la propagación viral. Por ejemplo, la 2-5 sintetasa dependiente de ARN de doble cadena (ARNbc) cataliza la formación de un oligonucleótido inusual, ppp (A2' p) nA (2-5A), necesario para activar una endonucleasa latente, la RNasa L, que degrada ARN mensajeros (ARNm) virales (Zhou, Hassel, & Silverman, 1993) requeridos para la replicación citoplasmática de virus de ARN pequeños (Picornaviridae) como el virus de encefalomiocarditis murina (EMCV) y virus Mengo (R. Kumar, Choubey, Lengyel, & Sen, 1988). Una segunda proteína antiviral importante inducida por IFN $\alpha$ , es una quinasa dependiente de ARNbc conocida como PKR, que fosforila e inactiva el factor de iniciación de péptidos eIF2 involucrado

en la transcripción poliribosomal de ARNm virales (Staeheli, 1990). La replicación de reovirus y rhabdovirus, como el virus de estomatitis vesicular (VSV), son en particular afectados, aunque el mecanismo antiviral de PKR también es activado en células infectadas con EMCV (Meager, 2002). Otra familia de ISGs que influyen en la transcripción son las proteínas p56 y p54, que inhiben la síntesis de proteínas al bloquear la acción del factor de iniciación de transcripción EIF3 (Sarkar & Sen, 2004). Ambas moléculas se unen a diferentes subunidades de EIF3 y bloquean algunas de sus diversas funciones. La transcripción de ARNm del virus de la hepatitis C (HCV) es inhibida con más fuerza por p56 que por ARNm celulares, porque su iniciación es mediada por el sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), y no mediada por CAP, de manera que inhibe de manera selectiva la síntesis proteica (C. Wang et al., 2003).

Las proteínas Mx, otra familia de ISGs, son GTPasas grandes (~80 kDa) de la superfamilia de las dinaminas que se auto ensamblan y se unen a nucleocápsides virales. Esto interfiere con el tránsito y actividad de polimerasas virales, inhibiendo entonces la replicación de varios virus de ARN incluyendo los virus de la influenza y del sarampión (Haller, Staeheli, & Kochs, 2007). MXA, homólogo humano del Mx1 murino, es una proteína citoplasmática que se asocia con membranas intracelulares (Borden et al., 2007).

El gen ISG15 codifica una proteína similar a ubiquitina de 15 kDa que modifica más de 100 proteínas a través de un proceso conocido como ISG-lación (ISGylation) (Andersen & Hassel, 2006). ISG15 inhibe la liberación del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) de las células, mimetizando el efecto de IFN (Okumura, Lu, Pitha-Rowe, & Pitha, 2006) en infecciones por virus influenza, herpes y Sindbis (Lenschow et al., 2007). El mecanismo antiviral de ISG15 *in vivo* es desconocido, pero

podría relacionarse con la actividad de las siguientes moléculas: proteína 1 de unión a guanilato (GBP1), una 3'-5' exonucleasa codificada por ISG20, proteína de leucemia promielocítica (PML), adenosina deaminasa (ADAR1), proteína asociada al retículo endoplásmico Viperina (cig5) que puede inhibir citomegalovirus humanos, sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS), y nucleoporinas Nup98 y Nup96 (Andersen & Hassel, 2006).

Muchas proteínas en las vías de señalización de IFN son los propios ISGs, proveyendo así un bucle autocrino que amplifica la respuesta de IFN. Ejemplos de éstas son IRF7, RIG-1, MDA5 y STAT1. Dado que la funcionalidad de ISG con altos niveles de inducción transcripcional todavía no están caracterizados por completo, algunos podrían resultar ser mediadores críticos de acciones antivirales y de otro tipo (Samuel, 2001). Debido a que todos los efectos biológicos de los IFN están mediados por la acción de los ISG, aún resta comprender cómo las funciones de los productos proteínicos de éstos podrían conducir a un antiviral más eficaz (Borden et al., 2007).

### ***Actividad antiproliferativa del IFN $\alpha$***

Más allá de participar en el estado antiviral, los sistemas "2-5A sintetasa – Rnasa L" y "PKR – eIF2" también están involucrados en la proliferación celular (Tan & Katze, 1999). Los niveles de 2-5A sintetasa se han encontrado elevados en células con crecimiento interrumpido, sugiriendo su participación en la regulación de la proliferación (Lengyel, 1993). Por otro lado, debido a que PKR puede ser activada por mediadores distintos del ARN de doble cadena, se ha implicado en acciones antiproliferativas y apoptóticas inducidas por IFN (Tan & Katze, 1999). También se ha reportado que los interferones de tipo I inhiben la quinasa dependiente de ciclina CDK-2, que media la fosforilación de la proteína retinoblastoma (rb), con lo que contribuye a la actividad

antiproliferativa (Qin, Runkel, Deck, DeDios, & Barsoum, 1997). Una serie de otros mecanismos inducidos por IFN, incluyendo el incremento de la rigidez celular, disminución de la expresión de metabolitos esenciales, y supresión de oncogenes, pueden contribuir a la actividad antiproliferativa de IFN (Meager, 2002).

Se conoce que el IFN $\alpha$  afecta también diferentes fases del ciclo mitótico en distintos sistemas celulares, siendo el efecto más común el arresto en G1 (Roos, Leanderson, & Lundgren, 1984). Las células eucarióticas son dependientes de la formación secuencial y activación de una serie de proteínas quinasas serina/treonina que comprenden el componente regulador ciclina y un componente catalítico conocido como quinasa dependiente de ciclina (Cdk) (Grandér, Sangfelt, & Erickson, 1997). El IFN $\alpha$  regula en positivo a inhibidores de Cdk, llevando a la reducción de su actividad quinasa y resultando en el arresto en G1, en etapas tempranas del tratamiento (Matsuoka, Tani, & Asano, 1998). Existen otras rutas de inactivación que conllevan al arresto en G1, e incluso se ha observado que IFN $\alpha$  puede provocar arresto en G0 (Bekisz, Baron, Balinsky, Morrow, & Zoon, 2010).

### ***IFN $\alpha$ en la inmunidad innata y adaptativa***

El IFN $\alpha$  constituye un puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (Ri et al., 2020), por su capacidad para promover la apoptosis dependiente de caspasa en ciertos tipos de cáncer, por tener efectos anti-angiogénicos en la vascularización tumoral, aumenta la citotoxicidad y supervivencia de las células *natural killer* (NK), inducir la generación y supervivencia de linfocitos T citotóxicos y células T CD8 de memoria, y promover la maduración de células dendríticas (Conlon et al., 2019). Para las pDCs, principales productoras de IFN $\alpha$ , la molécula actúa como un factor de supervivencia autocrino, aunque no estimula su diferenciación en células dendríticas

(Asselin-Paturel et al., 2001). Por el contrario, se ha demostrado que el IFN $\alpha$  promueve que los monocitos de sangre periférica se diferencien en DCs con un aumento en su capacidad estimuladora de células T (Paquette et al., 1998). Además, estas DCs inducen una potente respuesta de anticuerpos primarios (Santini et al., 2000). Adicional a esto, las DCs que son tratadas con IFN $\alpha$  expresan niveles mayores de MHC de clase I y clase II, CD83, CD40, CD80, CD86, y tienen una mayor habilidad para estimular la proliferación de células (Luft et al., 1998). Esto puede explicarse por el hecho de que las DCs con maduración estimulada por IFN $\alpha$  tienen una mayor expresión del receptor de la quimiocina CCR7, la cual es necesaria para la entrada de DCs en los nódulos linfáticos, que a su vez es requisito para la iniciación de las respuestas de células T (Gunn et al., 1999).

### ***Rol del IFN $\alpha$ en la inmunidad mucosal***

Las superficies mucosas, que pueden superar los 300 m<sup>2</sup> en humanos, son en particular vulnerables a infecciones (McGhee & Fujihashi, 2012). Por tanto, los mamíferos superiores han desarrollado un sistema inmune mucoso para protegerse de los elementos tóxicos que ingresan al cuerpo a través de las membranas mucosas (O'Hara & Shanahan, 2006). Puede verse como una simple capa de epitelio cubierto por mucus y proteínas antimicrobianas que se refuerza con varios aspectos de la inmunidad innata y adaptativa (Nicholson et al., 2012). El sistema inmunológico de la mucosa (MIS) puede ser dividido en sitios inductores y efectores basados en sus propiedades anatómicas y funcionales. Los sitios inductores de la mucosa son en colectivo llamados tejido linfoide asociado a mucosa (MALT) e incluye los tejidos linfoides asociados al intestino (GALT), tejido linfoide asociado a la nasofaringe (NALT) y sitios linfoides. MALT provee una fuente continua de células B de memoria y células T que luego se

movilizan a los sitios efectores (Fujihashi, Boyaka, & McGhee, 2008). Los sitios efectores mucosos incluyen las regiones de lámina propia de los tractos gastrointestinal, respiratorio superior y reproductivo, así como tejidos glandulares secretores. Estos sitios contienen células efectoras antígeno-específicas como células plasmáticas productoras de IgA, células B de memoria y células T (Brandtzaeg, 2007).

Al producirse una infección, la consecuencia más importante es la respuesta inflamatoria. La liberación de citoquinas y quimiocinas es clave para la inducción de una respuesta inmune adaptativa. Los mediadores inflamatorios estimulan la maduración de células dendríticas y otras células presentadoras de antígenos, para que expresen las moléculas co-estimuladoras que proporcionan las señales adicionales para la activación y expansión de linfocitos *náive* (Janeway, Travers, Walport, & Shlomchik, 2001).

Durante una infección viral, la barrera mucosa constituye la primera línea de defensa (Kudo et al., 2019). Si el virus logra sobrepasar esta barrera, las células epiteliales de la mucosa producen citoquinas pro-inflamatorias, IFN de tipo I y péptidos antimicrobianos como las defensinas (Wira, Patel, Ghosh, Mukura, & Fahey, 2011). Los macrófagos residentes en el tejido, DCs y las células  $\gamma\delta$  T propias del tejido mucoso y epitelial, también reconocen de inmediato luego de la infección inicial los PAMPs virales a través de RIG-I y TLR7 (Kudo et al., 2019), y secretan IFN $\alpha$  y otras citoquinas antivirales (Iwasaki, 2010) para activar ISGs y bloquear la propagación del virus (Iwasaki & Pillai, 2014). Las DCs tienen la capacidad para vincular la detección innata de virus con la generación de respuestas inmunes adaptativas (Kumamoto & Iwasaki, 2012).

Los IFN de tipo I son capaces de producir una respuesta antiviral a través de la activación de ISG3 (Durbin et al., 2013). Para infecciones sistémicas es requerida una respuesta funcional de IFN de tipo I, ya que sus receptores son expresados en la

mayoría de las células (García-Sastre et al., 1998). Adicional a las propiedades antivirales, los IFN de tipo I juegan un papel importante en la organización de la respuesta inmune adaptativa contra una infección viral. Esto sucede de forma indirecta con la regulación en la síntesis de citoquinas y quimiocinas, y a través de una acción directa en las células NK, dendríticas y linfocitos (Durbin et al., 2013). Estos IFNs incrementan la habilidad de las células dendríticas para presentar antígenos (Mattei, Schiavoni, Belardelli, & Tough, 2001), y han demostrado ser importantes en la presentación cruzada de células T y en la producción de anticuerpos específicos (Bon et al., 2003). Estos efectos en las células inmunes son mediados por la activación de STAT1, 3, 4 y 5, con diferentes respuestas, dependientes de los niveles relativos de cada proteína STAT (Gil et al., 2012). Más allá de la inhibición directa de la replicación viral por ISGs, un segundo nivel de acción de IFN aumenta las respuestas inmunes adaptativa y adquirida. La alerta temprana de la presencia de un patógeno la proporcionan las células dendríticas asociadas al tejido y las células dendríticas circulantes, un tipo de las cuales, la célula dendrítica plasmocitoide, es la célula productora de IFN de tipo I circulante (Borden et al., 2007).

En condiciones normales, bajos niveles de IFN $\alpha$  son secretados por las células dendríticas de la lámina propia y otros fagocitos. En respuesta a un ataque microbiano o lesión de tejido, la producción de IFN $\alpha$  por estas células aumenta, lo que a su vez actúa sobre las células T para suprimir la diferenciación celular de Th17 mientras se promueve la expansión de las células T regulatorias, limitando la inflamación. El IFN $\alpha$  también inhibe la producción de citocinas proinflamatorias, y actúa sobre las células epiteliales intestinales para restringir la proliferación y favorecer su diferenciación para establecer la integridad de la barrera (Kotredes, Thomas, & Gamero, 2017). Aparte de la

activación del TLR en las células en los lugares de invasión o replicación del patógeno, ocurre la presentación de fragmentos de péptidos derivados del agente microbiano, unidos a moléculas de superficie del complejo mayor de histocompatibilidad de superficie (MHC) clase II, a través de las células dendríticas (W. Zhao, Cha, Lee, Park, & Schindler, 2007). Las células infectadas que muestran fragmentos de péptidos asociados con el MHC-I en su superficie son reconocidas y eliminadas por las células T CD8+, suprimiendo así el virus. Los IFNs de tipo I pueden aumentar de forma notable la presentación del antígeno dependiente del MHC de clase I (Borden et al., 2007). Otros ISGs involucrados en el procesamiento de antígenos incluyen los componentes de permeabilización de la membrana lisosomal (LMP) de los proteasomas y transportadores para el procesamiento de antígenos (TAP), que transportan péptidos al retículo endoplásmico para cargarlos en proteínas nacientes de MHC-I (Groothuis & Neefjes, 2006). El IFN $\alpha$  también fomentan la acumulación de leucocitos en los sitios de invasión de patógenos, al promover la expresión de moléculas de adhesión vascular, incluida la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM1), junto con citoquinas como TNF $\alpha$  e IL1 $\beta$  (Borden et al., 2007).

### ***Uso clínico del IFN $\alpha$***

Hasta la fecha solo el subtipo IFN $\alpha$ -2 es utilizado en el tratamiento clínico contra infecciones virales crónicas (Sutter et al., 2018). Este subtipo cuenta con tres isoformas producidas a través de la tecnología de ADN recombinante: IFN $\alpha$ -2a, IFN $\alpha$ -2b, e IFN $\alpha$ -2c (Conlon et al., 2019). El IFN $\alpha$ -2b recombinante es un polipéptido de 165 residuos aminoacídicos, que difiere del IFN $\alpha$ -2a y del IFN $\alpha$ -2c en un solo aminoácido: en la posición 23 el IFN $\alpha$ -2b contiene arginina en lugar de la lisina del IFN $\alpha$ -2a, mientras que

en la posición 34 contiene histidina en lugar de la arginina del IFN $\alpha$ -2c (Lewczuk et al., 2019).

El IFN $\alpha$ , PEG-IFN $\alpha$ -2a y PEG-IFN $\alpha$ -2b están aprobados como tratamiento de hepatitis B y hepatitis C crónicas ( $\alpha$ -2b en combinación con ribavirina), y el IFN $\alpha$  como tratamiento adyuvante para pacientes con melanoma de alto riesgo en estadio III o IV resecado por completo, como tratamiento de primera línea para pacientes con carcinoma renal metastásico ( $\alpha$ -2a y  $\alpha$ -2b en combinación con bevacizumab), sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA ( $\alpha$ -2b), linfoma folicular ( $\alpha$ -2b), HCL ( $\alpha$ -2a,  $\alpha$ -2b), leucemia mielógena crónica con cromosoma Filadelfia positivo ( $\alpha$ -2a), condiloma acuminata ( $\alpha$ -2b) y cervical neoplasias intraperitoneales ( $\alpha$ -2b) (Lewczuk et al., 2019). Aún se realizan ensayos clínicos para investigar la utilidad del IFN $\alpha$  en combinación con terapias celulares, vacunas contra el cáncer e inhibidores de puntos de control inmunitarios, en su mayoría como agentes adyuvantes (Conlon et al., 2019).

Los efectos adversos más comunes provocados por el IFN $\alpha$  son fiebre, fatiga, dolor de cabeza, molestias gastrointestinales, y mialgias, que ocurren en el 80% de los pacientes. El IFN $\alpha$  produce aumentos en las enzimas hepáticas, en particular durante la administración intravenosa de dosis altas. La trombocitopenia, la leucopenia y la neutropenia también son frecuentes, al igual que problemas neuropsiquiátricos, como depresión (45%), confusión (10%) y manía (<1%), cambios electroencefalográficos y algunos casos de suicidios (Conlon et al., 2019).

Varios de los efectos secundarios producidos por el IFN $\alpha$  terapéutico, como los síntomas similares a la gripe o la depresión, parecen estar relacionados con la velocidad a la que se alcanza el pico de concentración sérica de la molécula. Una preparación de IFN $\alpha$  con un aumento lento hacia concentraciones pico podría tener

menos efectos adversos (Jansen & Bruijne, 2012). La encapsulación de la molécula es una alternativa que brinda la posibilidad de que la liberación sea controlada, y así evitar un pico de concentración sérica en un período de tiempo corto (Saez et al., 2012).

### **Nanopartículas**

El transporte y distribución de medicamentos mediado por nanopartículas (NPs) ha atraído la atención de la industria farmacéutica por los beneficios terapéuticos de las nanoformulaciones, entre los que se puede detallar la eficacia mejorada, transporte dirigido del medicamento, reducción en la cantidad de principio activo y reducción de efectos adversos (K. Park, 2014). Esta tecnología se propone obtener formulaciones que distribuyan el fármaco de forma selectiva, efectiva, y de manera sostenida en el sitio de requerimiento (Dai & Si, 2018).

El objetivo principal de las nanoformulaciones es afinar el perfil metabólico normal de fármacos establecidos mejorando su eficacia de forma significativa, liberación sostenida y disminuyendo los efectos adversos. La partícula transportadora del medicamento, además de cumplir con estos fines e incrementar la actividad del principio activo, reduce la degradación metabólica del fármaco (Sridhar & Ramakrishna, 2013). Los sistemas de distribución de fármacos basados en la nanotecnología incluyen nanoemulsiones, partículas lipídicas o poliméricas, liposomas, *vault* de proteínas, dendrímeros y micelios (Sharma et al., 2018). En la tabla 1 se resumen las principales terapias basadas en nanotecnología que se están desarrollando en la actualidad.

**Tabla 1**

*Terapias en desarrollo basadas en nanotecnología.*

<b>Estrategia</b>	<b>Aplicación</b>	<b>Referencias</b>
NPs poliméricas	Nanoencapsulación de fármacos	(Bhardwaj et al., 2006; Vauthier & Bouchemal, 2009)
NPs metálicas e inorgánicas	Transporte de fármacos con magnetismo Inducción de hipertermia en tumores	(Varadan, Chen, & Xie, 2008; Kennedy et al., 2011)
Sistemas auto-nanoemulsificantes	Transporte de fármacos hidrofóbicos	(Shah, Bhalodia, & Shelat, 2010)
NPs lipídicas	Transporte de fármacos hidrofóbicos	(Obeidat, Schwabe, Müller, & Keck, 2010; Zhuang et al., 2010)
<i>Vault</i> de proteínas (ribonucleoproteína)	Transporte de fármacos y vacunas	(Yu, Ng, Rome, Tolbert, & Monbouquette, 2008; Champion et al., 2009; Kickhoefer et al., 2009)
Dendrímeros	Encapsulación y transporte específico de fármacos	(Gillies & Fréchet, 2005; Svenson & Tomalia, 2012)
Micelios poliméricos y polimerosomas	Encapsulación y transporte específico de fármacos	(Kedar, Phutane, Shidhaye, & Kadam, 2010; J. S. Lee & Feijen, 2012)

*Nota.* Tomado de Sharma et al. (2018).

### ***Nanopartículas poliméricas***

Los sistemas de distribución de fármacos basados en NPs poliméricas tienen las ventajas de bajo costo, escalabilidad, liberación dirigida, biodegradabilidad, biocompatibilidad, sostenibilidad en la liberación de la droga encapsulada, eficacia mejorada y baja toxicidad (Rizeq, Younes, Rasool, & Nasrallah, 2019). Los biopolímeros de origen de carbohidratos como el quitosano, alginato, almidón, celulosa, y de origen proteínico, como la albúmina, gelatina, colágeno y proteínas de seda tienen ventajas adicionales sobre los polímeros sintéticos cuando una estabilidad duradera puede estar comprometida (Sridhar & Ramakrishna, 2013). Los nanomateriales biocompatibles con una alta área superficial específica son deseables para el transporte de medicamentos (Rizeq et al., 2019). Existen polímeros sintéticos que son biocompatibles y menos biodegradables respecto a los polímeros naturales, y entre éstos se incluyen polilactidas (PLA), poliglicoles (PGA), poli(lactida-co-glicoles) (PLGA), polioctoésteres y polianhídridos. Estos sistemas modifican el perfil farmacocinético normal del fármaco terapéutico nanoencapsulado y colaboran en su liberación dirigida y sostenida. Además, superan la barrera de la administración sistémica, que es la única forma de administración para una amplia gama de ingredientes farmacéuticos activos (Yokoyama, 2010; Sridhar & Ramakrishna, 2013).

Los biopolímeros son biocompatibles, biodegradables y no inmunogénicos, además que se encuentran disponibles en abundancia en fuentes naturales (S. S. D. Kumar, Rajendran, Houreld, & Abrahamse, 2018). En partículas transportadoras de fármacos, el principio activo se libera a partir de la destrucción del polímero y su remoción de la superficie, donde es absorbido y dispersado (Bhardwaj et al., 2006). Los estudios preclínicos han mostrado resultados prometedores, y se están llevando a cabo

ensayos clínicos para verificar la seguridad y eficacia de estos sistemas (Sharma et al., 2018).

### **Quitosano (CS)**

El CS es un polisacárido catiónico lineal natural y un polímero hidrofílico obtenido por desacetilación alcalina de la quitina, uno de los polisacáridos más abundantes en el mundo, no tóxico, biocompatible y compuesta por unidades de d-glucosamina (desacetiladas) y N-acetil-d-glucosamina (acetiladas) unida a  $\beta$ -(1, 4) distribuidas de manera aleatoria (Muxika, Etxabide, Uranga, Guerrero, & de la Caba, 2017). El CS tiene numerosos grupos funcionales hidroxilo (-OH) y amino (-NH<sub>2</sub>) que se pueden emplear para reaccionar con agentes de reticulación para producir entrecruzamiento químico *in situ*. De acuerdo con su peso molecular, el CS puede clasificarse en dos tipos: de bajo peso molecular (LMWC), con un peso de 50-190 kDa; y de alto peso molecular (HMWC), con un peso de 310-375 kDa (Patrulea, Ostafe, Borchard, & Jordan, 2015).

Este polímero es biocompatible, ha demostrado no ser tóxico tanto *in vitro* (Wimardani et al., 2012) como *in vivo* (Ylitalo, Lehtinen, Wuolijoki, Ylitalo, & Lehtimäki, 2002), y es biodegradable por ciertas enzimas que lo descomponen en oligosacáridos no tóxicos que no producen reacciones inflamatorias, lo que hace que sea apropiado para uso clínico (Mohebbi et al., 2018). Los materiales basados en CS utilizados en aplicación biomédica han tenido éxito como agentes antimicrobianos, transportadores con liberación controlada de fármacos, materiales de detección para el monitoreo de biomoléculas, apósitos para heridas, anticoagulantes sanguíneos, biomateriales de regeneración ósea, y en ingeniería de tejidos (Ramya, Venkatesan, Kim, & Sudha, 2012). Adicional a esto, derivados y CS-NPs han demostrado tener un rendimiento

excelente en oftalmología, odontología, bioimagen, biodetección, y diagnóstico (M. Dash, Chiellini, Ottenbrite, & Chiellini, 2011).

El CS es uno de los polímeros naturales más populares con una amplia aplicación en el transporte de fármacos debido a su funcionalidad catiónica y solubilidad en medio acuoso (Bellich, D'Agostino, Semeraro, Gamini, & Cesàro, 2016). La encapsulación de medicamentos en CS-NPs mejora su absorción y biodisponibilidad, así como los protege de la degradación enzimática (Senapati, Mahanta, Kumar, & Maiti, 2018). Las CS-NPs pueden sintetizarse por diversas técnicas: complejación de polielectrolitos, gelificación ionotrópica, evaporación de solvente/co-precipitación, microemulsificación, coacervación compleja, difusión del solvente de emulsificación (Sonaje et al., 2010), y *electrospray* (Abyadeh et al., 2017). El tamaño, potencial zeta, y eficiencia de encapsulación de las CS-NPs dependen de la concentración del polímero, pH del medio y concentración del producto a encapsular (Dounighi, 2018).

### **Síntesis de nanopartículas mediante *electrospray***

Las técnicas electrohidrodinámicas (EHD) son procedimientos que utilizan fuerzas electrostáticas como fuerza conductora para fabricar fibras o partículas de diferentes formas con tamaños nanométricos a micrométricos, a través de un chorro de fluido con carga eléctrica. El tamaño, morfología y composición de las estructuras pueden modularse a partir de los parámetros del proceso y del material con el que se esté trabajando, y por ello, se puede personalizar el perfil de liberación de un principio activo encapsulado (Zamani, Prabhakaran, & Ramakrishna, 2013).

La técnica de *electrospray*, también conocida como pulverización electrodinámica o electropulverización, es una técnica basada en la atomización de

líquidos, capaz de producir diminutas gotas de tamaño submicrómetro mediante la acción de un campo eléctrico (Khan, Nazir, & Maan, 2017). El *electrospray* también puede utilizarse para producir partículas poliméricas finas, que se utilizan para aplicaciones biomédicas, en particular para el encapsulamiento de medicamentos (Jiamian Wang et al., 2019). Dentro de la clasificación de los métodos de síntesis de NPs *top down* y *bottom up*, la técnica *electrospray* pertenece a la categoría *top down*, en la que partículas grandes son desglosadas en NPs al aplicar una diferencia de carga potencial (Sridhar & Ramakrishna, 2013).

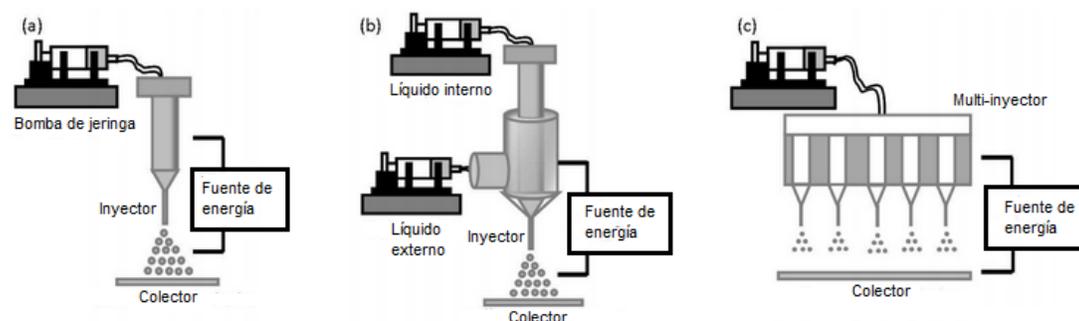
En la configuración estándar del *electrospray*, un líquido conductor es inyectado de forma lenta a través de un capilar por una bomba de jeringa. Un potencial eléctrico es aplicado al capilar para introducir carga en la superficie del líquido. Esta carga genera una tensión eléctrica que causa que el líquido se separe de la aguja (Jiamian Wang et al., 2019). Cuando el potencial eléctrico aumenta hasta varios kilovoltios, el menisco del líquido en la abertura del capilar adopta una forma cónica, conocida como cono de Taylor. En el ápice del cono, donde la carga está muy concentrada, se observa un chorro líquido con una alta densidad de carga. Se forman partículas monodispersas cuando el chorro se rompe en partículas finas debido a la repulsión coulombica de las cargas (Loscertales et al., 2002). Las gotas de tamaño micrométrico que se forman en un inicio contienen el solvente y el soluto no volátil, y las NPs se producen cuando el solvente se evapora del aerosol de gran área superficial (Y. Wu, Duong, James, & E., 2012).

Se pueden realizar otras configuraciones de *electrospray*, tales como la coaxial, donde dos líquidos son alimentados a través de una aguja interna y otra externa, respectivamente. Esta configuración se usa para producir NPs estructuradas. Por otro

lado, como la tasa de flujo en un proceso sencillo de *electrospray* es bajo ( $\mu\text{l/h}$  o  $\text{ml/h}$ ), se han desarrollado configuraciones múltiples con el fin de escalar la producción (Deng, Klemic, Li, Reed, & Gomez, 2006). En este caso, el capilar simple es reemplazado por un multi-inyector (Y. Wu et al., 2012). En la figura 2 se muestra un esquema de las tres configuraciones mencionadas.

**Figura 2**

*Configuraciones de la técnica de electrospray.*

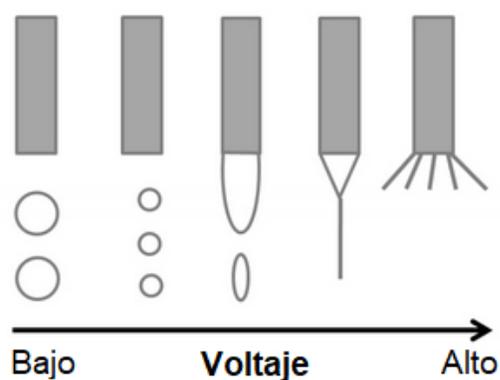


*Nota. (a) Sencilla, (b) Coaxial, (c) Múltiple. Fuente: Y. Wu et al. (2012).*

La formación del cono tiene una dependencia directa del flujo y voltaje aplicados. Los parámetros de trabajo varían de acuerdo con el polímero y la concentración que se utilice, de manera que a valores de flujo fuera de un rango específico (que depende del polímero y su concentración), el menisco se torna inestable y caen gotas en el colector de manera. Asimismo, como se observa en la figura 3, un voltaje bajo es insuficiente para generar el cono, formándose gotas que se depositan en el colector. A medida que se incrementa el voltaje, el cono se empieza a formar, hasta producirse varios chorros. Si se aplica un voltaje superior, los chorros se desestabilizan y las partículas no se forman (Y. Wu et al., 2012).

### Figura 3

*Influencia del voltaje aplicado en la formación del cono de Taylor.*



*Nota.* Fuente: Y. Wu et al. (2012).

El tamaño y la morfología de las partículas pulverizadas con electricidad pueden controlarse en cierta medida por los factores relacionados con las soluciones de polímeros (por ejemplo, la concentración, la viscosidad de corte) (M. K. Kim et al., 2015), el peso molecular del polímero, el disolvente (J. Lu, Hou, Yang, & Tang, 2015), y el proceso de pulverización eléctrica (por ejemplo, el caudal, la diferencia de potencial eléctrico, la distancia entre la punta de la aguja y el colector) (Smeets, Clasen, & den Mooter, 2017).

En comparación con otros métodos convencionales, el *electrospray* tiene varias ventajas en lo que respecta a la producción de partículas poliméricas cargadas con un principio activo para aplicaciones biomédicas. En primer lugar, el proceso puede realizarse en condiciones ambientales (temperatura y presión) lo que resulta beneficioso para biomoléculas sensibles e incluso para células vivas (Jiamian Wang et al., 2019). En segundo lugar, la eficacia de encapsulación puede maximizarse debido a la ausencia de un medio externo que permita la disolución o migración de las cargas

solubles en agua (Sosnik, 2014). Tercero, puede proporcionar de manera reproducible nano y micropartículas cargadas con fármacos (desde 5 nm hasta 100  $\mu\text{m}$ ) con una distribución de tamaño estrecha (D. R. Chen & Pui, 1997). En cuarto lugar, la repulsión Coulómbica entre las gotas con carga eléctrica provoca una auto-dispersión sin coalescencia de las partículas (Y. Xu & Hanna, 2006); y quinto, se pueden obtener diferentes estructuras a través del ajuste de los factores de solución y parámetros de procesamiento, como microesferas huecas, nanocapas, partículas porosas, micropartículas en forma de célula, microesferas de núcleo/capas múltiples y partículas Janus (Jiamian Wang et al., 2019).

Esta técnica se ha utilizado para la síntesis de partículas portadoras de varios componentes bioactivos, entre los que se incluyen células (*bio-electrospraying*, BES), genes, factores de transcripción, enzimas y otras proteínas. Estos transportadores pueden aplicarse para transporte y liberación de fármacos, como agentes de contraste en imágenes biomédicas diagnósticas y terapéuticas, como recubrimiento de implantes, y en ingeniería de tejidos (Jiamian Wang et al., 2019). La técnica, aunque no realiza una modificación biológica o química compleja, sí que implica una delicada ingeniería y manipulación de materiales (Naqvi et al., 2016). Desde una perspectiva técnica, es un enfoque rápido y de un solo paso para preparar portadores para uso biomédico. Sin embargo, el escalamiento de este proceso requiere mucha investigación. Para aumentar la eficiencia de la preparación, se creó un novedoso proceso de preparación utilizando un aparato sin aguja con dos placas de vidrio paralelas con espacios estrechos entre ellas (0,35 mm) como microcanales para el líquido de pulverización electrostática. El borde de la placa a la salida de los canales estaba afilado y ranurado para ayudar al flujo del fluido. Se formaron múltiples chorros de pulverización después

de la aplicación del potencial eléctrico, lo que dio como resultado una tasa de producción muy alta (Jordahl, Ramcharan, Gregory, & Lahann, 2017). En otro trabajo, se describió un dispositivo emisor multiporoso similar a una flauta para sustituir a los capilares de pulverización convencionales para la producción a gran escala (C. Zhang et al., 2015). En BES, se logró diseñar una hilera de agujeros múltiples personalizada que podía producir chorros continuos y estables con una eficiencia entre cinco y siete veces mayor sin afectar a la morfología, la viabilidad y la proliferación de las células endoteliales vasculares umbilicales humanas (T. Zhang et al., 2016). Los disolventes orgánicos utilizados durante la pulverización eléctrica representan una limitación de esta técnica, pues pueden dañar la bioactividad de los genes, las enzimas y la vitalidad de las células. Una alternativa para reducir la toxicidad que pueda comprometer la integridad biológica es el “*electrospraying* verde”, que consiste en el uso de disolventes benignos y acuosos, así como polímeros que se disuelvan en los mismos (Agarwal & Greiner, 2011).

### **Caracterización física de nanopartículas**

Las diferencias entre el comportamiento fisicoquímico de la materia prima macroscópica y las NPs fabricadas con estos elementos pueden ser muy grandes, y a veces, inesperadas, por lo que no es posible predecir las características y comportamientos de los nanomateriales en ambientes controlados, mucho menos en sistemas biológicos; por esta razón la aplicación biomédica de las NPs materiales debe ser acompañada por una cuidadosa caracterización. Estas diferencias a menudo se atribuyen a fenómenos frecuentes que ocurren cuando los materiales se vuelven nanométricos, como la alta relación de área superficial a masa, o los efectos de confinamiento cuántico o físico (Brown et al., 2010). También se ha vuelto evidente que

las características a nanoescala y el material particulado pueden tener un efecto dramático en los sistemas fisiológicos. Se ha demostrado que la adsorción de proteínas (Jiang, Jiang, Jin, Wang, & Dong, 2005) y las funciones celulares (adhesión, diferenciación, crecimiento, motilidad y morbilidad) (Yim et al., 2005) se alteran de manera significativa por la presencia de asperezas a nanoescala y dominios químicos (Brown et al., 2010).

Para acelerar la transición de una formulación de laboratorio a un producto efectivo en el ámbito clínico, es imperativo emplear tecnologías adecuadas para caracterizar la medicina, correlacionar sus efectos y consecuencias biológicas, y predecir los resultados terapéuticos en sustratos clínicos en la etapa temprana del desarrollo de productos (Cho et al., 2013), pues la caracterización incompleta de las propiedades de un nanosistema antes de los estudios preclínicos es uno de los mayores obstáculos que limitan el traslado de los resultados de laboratorio de nanomateriales a terapias humanas (Fornaguera & Solans, 2018).

### ***Distribución de tamaño***

El tamaño de las partículas es el atributo reportado con mayor frecuencia en los estudios de NPs; sin embargo, en muchas ocasiones es caracterizado de forma insuficiente. Este es un descuido crítico pues la evidencia indica que las interacciones biológicas con NPs puede ser dependiente del tamaño (Brown et al., 2010). El perfil de deposición de la materia particulada inhalada, la habilidad de las partículas para translocar en el cuerpo, la captación celular, y la actividad de la biomolécula adsorbida son unas de las pocas interacciones que dependen del tamaño de las partículas (Oberdörster, Oberdörster, & Oberdörster, 2005). Para diagnóstico y aplicaciones terapéuticas, la farmacocinética de las NPs puede ser influenciada por el tamaño

(Perrault, Walkey, Jennings, Fischer, & Chan, 2009). Los sistemas particulados rara vez son cien por ciento monodispersos, en particular en entornos biológicos, sino que más bien consisten en una población de partículas o agregados, que tienen diferentes clases de tamaño. Por esta razón se recomienda determinar la distribución de tamaño en lugar de reportar solo valores promedios, así como calcular la homogeneidad de la distribución de las formulaciones (Cho et al., 2013), expresada como el índice de polidispersidad (PDI), que es un parámetro adimensional calculado a partir de un análisis acumulativo de la función de autocorrelación de intensidad medida por la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS) (Brown et al., 2010).

El PDI permite conocer si un conjunto de NPs es homogénea respecto a su tamaño. Si el parámetro oscila entre valores de 0.1-0.25, significa que la población es monodispersa, mientras que valores mayores a 0.5 indican una amplia distribución de tamaño (X. Y. Lu, Wu, Li, & Chen, 2011). Es importante que una formulación sea monodispersa, ya que éste es un requerimiento para que el sistema de transporte sea considerado seguro, estable y eficiente (Danaei et al., 2018).

Para la determinación de la distribución de tamaño y PDI en general se utilizan dos métodos: DLS y microscopía electrónica. La evaluación por DLS mide el movimiento Browniano de las NPs en suspensión y relaciona su velocidad, o coeficiente de difusión traslacional, con el tamaño (Cho et al., 2013), en tanto que la microscopía electrónica proporciona una evaluación precisa del tamaño y la forma de una nanopartícula, aunque requiere a menudo de complejas técnicas de preparación que pueden alterar la muestra y crear artefactos (Mahl, Diendorf, Meyer-Zaika, & Epple, 2011).

### ***Carga superficial***

En la caracterización física de las NPs, otro de los parámetros que se debe analizar es su carga superficial, pues esta propiedad influye en el estado de aglomeración, en la adsorción de iones y biomoléculas en la interfaz de los sistemas nanoparticulados, así como en su potencial de captación celular y distribución intracelular (Brown et al., 2010). La carga superficial de un sistema particulado se reporta como el potencial zeta (Adamson & Gast, 1997), cuantificado en función de la velocidad de movimiento de las partículas en un campo eléctrico aplicado. En concreto, el potencial zeta es el signo y la magnitud de carga (expresada en mV) que existe entre la capa de líquido adsorbida a la superficie de la partícula en movimiento, y el medio circundante, y depende de las especies adsorbidas en la superficie y de la fuerza iónica de la solución circundante (Brown et al., 2010).

En general, partículas con potencial zeta mayor que +30 mV o menor que -30 mV tienen estabilidad coloidal mantenida por repulsión electrostática (Murdock, Braydich-Stolle, Schrand, Schlager, & Hussain, 2008). Este parámetro se mide por electroforesis láser Doppler (Cho et al., 2013), titulaciones potenciométricas (Brown et al., 2010), y DLS (Bondar, Saifullina, Shakhmaeva, Mavlyutova, & Abdullin, 2012). El valor del potencial zeta es dependiente del pH, iones contenidos en la suspensión, presencia de potenciales adsorbidos y concentración de hidrógeno en el medio (Cho et al., 2013).

## Capítulo 3

### Materiales y métodos

#### Diseño experimental

El objetivo del presente trabajo fue obtener una formulación que permita nanoencapsular al interferón alfa 2b recombinante humano (rhIFN $\alpha$ -2b) como principio activo, dada su capacidad de activar un estado antiviral celular. Se obtuvo la molécula, producida en *E. coli*, y se verificó su pureza y actividad biológica. Una vez determinadas estas dos características, se procedió a la elaboración de una nanoformulación, utilizando LMWC como polímero que encapsule al rhIFN $\alpha$ -2b. La nanoencapsulación se realizó mediante la técnica de *electrospray*, optimizando la diferencia de voltaje requerida para la obtención de NPs, evaluadas por microscopía electrónica de transmisión, de barrido, y de transmisión y barrido. Este análisis determinó la morfología y distribución del tamaño de la nanopartícula. Además, se estimó la cinética de liberación de la molécula, y su relación con la actividad biológica.

#### Producción de rhIFN $\alpha$ -2b en *E. coli*

Para la expresión del rhIFN $\alpha$ -2b en *E. coli* se desarrolló una producción de 2.5 litros de fermentación. Se utilizó la cepa *SHuffle*<sup>®</sup> T7 Express Competent *E. coli* (Neb, EE. UU.) (Arif, Gardner, Rashid, & Akhtar, 2015) transformada con el vector plasmídico pET22b(+)-hIFN $\alpha$ -2b (*GenScrip*, EE.UU.). El gen de interés para la expresión de rhIFN $\alpha$ -2b se encontraba en este vector, y el control de la expresión se realizó con el promotor T7 inducible por IPTG. El laboratorio de Fisiopatología y Biofármacos Recombinantes de la Universidad de Concepción donó la cepa *SHuffle T7/rhIFN $\alpha$ -2b* transformada con el vector plasmídico.

Un vial de células de esta cepa fue descongelado, y una muestra se sembró en una placa de Agar Luria Bertani (LB) + ampicilina 100 µg/ml, que fue incubada a 30°C durante 24 horas (El-Baky, Linjawi, & Redwan, 2015). A continuación, se tomó una colonia para sembrarla en un precultivo de medio Terrific Broth (TB) + glicerol 0.4% + ampicilina 100 µg/ml, que se incubó durante 20 horas a 30 °C en agitación constante. Este precultivo fue utilizado para inocular un volumen más grande del mismo medio, que se fermentó a iguales condiciones hasta que la densidad óptica del cultivo alcanzó un valor de 0.8-0.9 uDO/ml. La expresión del rhIFN $\alpha$ -2b se indujo añadiendo isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0.4 mM, e incubando durante 6 horas a 30°C en agitación constante (Arif et al., 2015).

### **Purificación de rhIFN $\alpha$ -2b**

#### ***Ruptura de la biomasa***

Una vez concluido el tiempo de inducción, se recuperó la biomasa al centrifugar el contenido de los cultivos a 11000 rpm por 30 minutos, pues en esta fracción se encontraba el rhIFN $\alpha$ -2b. El sobrenadante fue descartado, y la biomasa se resuspendió en buffer Tris/Cl 50 mM + PMSF 0.1 mM pH 7.5, utilizando una relación de un litro de buffer por cada 100 g de biomasa. La disrupción celular se realizó por el método de homogenización líquida utilizando una prensa francesa (Avestin, Canadá). Se realizaron diez pases de la biomasa resuspendida, y luego se centrifugó a 10000 rpm por 25 minutos. Los 100 ml de fracción soluble fueron recuperados, y la fracción insoluble fue resuspendida en igual volumen de agua destilada (El-Baky et al., 2015).

### ***Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE y Western Blot***

La visualización de la proteína por SDS-PAGE en las diferentes fracciones obtenidas durante el proceso de purificación se realizó en geles de poliacrilamida al 15% (Katla et al., 2019). Se prepararon las muestras añadiendo buffer de carga con beta-mercaptoetanol. La electroforesis se corrió a 120 V durante 10 minutos, y a 150 V por 1 hora y 10 minutos. Las bandas de proteínas se visualizaron con azul de Coomassie R350 0.1% (w/v), metanol 20% (v/v), ácido acético 10% (v/v) en agua destilada durante 30 minutos en agitación constante. A continuación se destiñó con solución de destinción (metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v) en agua destilada) durante 2 horas en agitación constante. Para la observación de las bandas, el gel fue revelado en el equipo Odyssey CLx (LI-COR Biosciences, EE. UU.).

La técnica de Western Blot se aplicó para verificar que la proteína correspondía al rhIFN $\alpha$ -2b (Katla et al., 2019). Las bandas del gel, separadas mediante SDS-PAGE, fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa con buffer de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.25% (w/v), metanol 20% (v/v) en agua destilada) en la cámara de transferencia semi-seca *Trans-Blot Turbo, Transfer System* (Bio-Rad, EE. UU.). La transferencia fue por 30 minutos a 25 V, 300 W, y 260 mA. Después, la membrana se incubó durante 2 horas en agitación con 5% leche descremada disuelta en TBS 1X), y por una hora con el anticuerpo primario anti-hIFN $\alpha$  (Santa Cruz, EE. UU.) por una hora. Una vez realizados tres lavados de 10 minutos cada uno, con solución TBS/Tween, se incubó la membrana por una hora con el anticuerpo secundario anti-mouse 790 nm (Jackson ImmunoResearch, EE. UU) diluido 1/30000. La membrana se lavó tres veces por 10 minutos cada una con TBS/Tween, para más adelante revelar la membrana en el equipo Odyssey CLx (LI-COR Biosciences, EE. UU.).

### ***Ultrafiltración de la fracción soluble***

La fracción soluble resuspendida fue clarificada en tres pasos: prefiltrado de fibra de vidrio, filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  y 0.22  $\mu\text{m}$ . Se diluyó con buffer Tris/Cl 50 mM pH 7.5 hasta llegar a 500 ml, y se pasó por un casete (Merck Millipore, EE. UU.) de 100 kDa mediante ultrafiltración tangencial, a velocidad media de la bomba. Después se pasaron 2 l de buffer, obteniéndose 2.5 l de filtrado y 50 ml de retenido. Se verificó la presencia de la proteína en ambas fracciones por SDS-PAGE, corriendo las muestras en un gel de poliacrilamida al 15%. (Kuruganti, Accavitti-Loper, & Walter, 2014)

Las muestras se prepararon mediante un proceso de precipitación de proteínas antes de ser cargadas en el gel (Koontz, 2014). Se añadieron 0.1 volúmenes de deoxicolato de sodio a la muestra, y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. A continuación se adicionaron 0.1 volúmenes de ácido tricloroacético, y se centrifugó a 11000 rpm por 15 minutos. Se desechó el sobrenadante, se adicionó 1 volumen de acetona fría y se centrifugó a 11000 rpm por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante, los tubos se dejaron secar por 10 minutos a temperatura ambiente, los pellets fueron resuspendidos en agua destilada, y se cargaron en el gel.

### ***Cromatografía de modo mixto (MMC)***

En el primer paso cromatográfico se eliminaron las proteínas contaminantes mediante interacciones hidrofóbicas y aniónicas, utilizando la matriz Capto Adhere Impres en lecho empaquetado (GE Healthcare, EE. UU.) (Arif, Mohammed, & Nadeem, 2018). La columna fue equilibrada a las condiciones iniciales deseadas con buffer de equilibrio (Tris-HCl 50 mM pH 8.0). La muestra, clarificada con anterioridad por filtro de 0.22  $\mu\text{m}$ , fue pasada por la columna de modo mixto una vez. Después se lavó la

columna con buffer de equilibrio hasta que la absorbancia retornó a la línea base del cromatograma, colectando la fracción no unida a la matriz. A continuación, se lavó con buffer de equilibrio + NaCl 300 mM hasta observar el pico de absorbancia y que ésta regrese a la línea base del cromatograma, colectando dicha fracción de lavado. Al finalizar, se eluyó con buffer citrato 50 mM pH 4.3 + NaCl 200 mM hasta observar el pico de absorbancia y que ésta regrese a la línea base del cromatograma, y se colectó la fracción eluida.

Se comprobó la presencia de la proteína en las fracciones de entrada, no unida, de lavado y de elución por SDS-PAGE, corriendo las muestras, preparadas con anticipación por precipitación, en un gel de poliacrilamida al 15%.

### ***Cromatografía de intercambio iónico (IEX)***

El segundo paso cromatográfico consistió en la eliminación de contaminantes mediante intercambio catiónico, utilizando la matriz GigaCap S-650S (Sigma-Aldrich, EE. UU.) (F. Ahsan, Gardner, Rashid, Towers, & Akhtar, 2018) en lecho empaquetado. Se equilibró la matriz pasando buffer de equilibrio (Citrato 50 mM pH 4.3), y la fracción eluida de la primera cromatografía fue pasada por la columna una vez. Una vez pasada toda la fracción de entrada, se lavó la columna con buffer de equilibrio hasta que la absorbancia retornó a la línea base del cromatograma, colectando la fracción no unida a la matriz. A continuación, se eluyó con buffer fosfato 160 mM pH 7.0 + NaCl 300 mM hasta observar el pico de absorbancia y que ésta regrese a la línea base del cromatograma, y se colectó la fracción eluida.

Se comprobó la presencia de la proteína en las fracciones de entrada, de lavado y de elución por SDS-PAGE, corriendo las muestras, preparadas con antelación por precipitación, en un gel de poliacrilamida al 15%.

### ***Concentración de la proteína***

Las proteínas presentes en la fracción eluida de la cromatografía de intercambio catiónico se concentraron empleando en paralelo dos casetes Minimate TFF OMEGA de 5 kDa de tamaño de poro (Musumeci, Leonardi, Bonaccorso, Pignatello, & Puglisi, 2018). Antes de proceder, los casetes fueron lavados con agua purificada. A continuación, se equilibró el casete con buffer fosfato 160 mM pH 7.0 + NaCl 300 mM. La muestra, con anterioridad clarificada por filtro de 0.45  $\mu$ m de PVDF, comenzó a pasarse por los casetes a velocidad media. El procedimiento se realizó hasta que el volumen inicial se redujo 12.5 veces.

### ***Cuantificación de la concentración de proteínas totales***

Las proteínas presentes en la fracción correspondiente al segundo pico de absorbancia de la cromatografía de exclusión molecular se cuantificaron con el kit Pierce Ácido Bicinconínico (BCA) Protein Assay Kit (Thermo Scientific Pierce, EE. UU.) de acuerdo con las indicaciones del fabricante (Olson, 2016). Se realizó una curva de calibración de BCA utilizando albúmina de suero bovino (BSA) con un rango de concentraciones entre 0.1 y 1.0 mg/mL, además de agua destilada como blanco. Se colocaron diluciones  $\frac{1}{2}$  y  $\frac{1}{10}$  de la muestra en una placa de 96 pocillos, que se incubó a 37° C durante 30 minutos, luego a temperatura ambiente en oscuridad por 10 minutos. La placa se leyó a 562 nm en espectrofotómetro SpectroStar Nano (BMG LABTECH,

Alemania). Se determinó la concentración de las muestras a partir de la curva de calibración con el software Excel 2019 (Microsoft, EE. UU.).

### ***Cromatografía de exclusión molecular***

El último paso cromatográfico consistió en retirar de la muestra varios componentes no desados en base a su tamaño, utilizando una matriz de exclusión molecular. La columna fue equilibrada pasando buffer fosfato 160 mM pH 7.0 + NaCl 300 mM a 1.5 ml/min, luego se inyectaron 5 ml del concentrado en la columna, y se continuó pasando buffer hasta que se observaron dos picos de absorbancia, el segundo correspondiente al rhIFN $\alpha$ -2b. La inyección a la columna se realizó cuatro veces para completar el pase de los 20 ml de concentrado. Las fracciones correspondientes a ambos picos fueron recolectadas en cada ciclo de inyección (Katla et al., 2019).

Se comprobó la presencia de la proteína en las fracciones de entrada, del primer pico de absorbancia y del segundo pico de absorbancia por SDS-PAGE y Western Blot, corriendo las muestras, preparadas con anticipación por precipitación, en un gel de poliacrilamida al 15%.

Las proteínas presentes en la fracción correspondiente al segundo pico de absorbancia de la cromatografía de exclusión molecular se cuantificaron con el kit Pierce Ácido Bicinconínico (BCA) Protein Assay Kit (Thermo Scientific Pierce, EE. UU.) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Finalmente, la muestra fue clarificada por filtro de 0.22  $\mu$ m, y se volvió a cuantificar la cantidad de proteínas presentes por el método BCA.

### ***Determinación de la pureza de rhIFN $\alpha$ -2b***

La pureza de rhIFN $\alpha$ -2b en la fracción eluida de la cromatografía de exclusión molecular se determinó por densitometría en gel de SDS-PAGE. Se colocaron 1, 2, 5, 7.5, 10 y 15  $\mu$ l de la muestra en microtubos y se llevaron a un volumen de 20  $\mu$ l con agua destilada. El contenido se cargó en un gel de poliacrilamida al 15% y se ejecutó la electroforesis. El gel fue escaneado y su imagen fue analizada en el software ImageJ (National Institute of Health, EE. UU.). Para determinar el porcentaje de cada proteína respecto al total de proteínas se cuantificó el área bajo la curva del pico de intensidad de cada banda, en el último carril en el cual la banda correspondiente al rhIFN $\alpha$ -2b no llegó al punto de saturación. Para la banda del rhIFN $\alpha$ -2b, el porcentaje de área bajo la curva respecto del total fue la pureza de la proteína (Villela et al., 2020).

### ***Cambio de buffer***

Con el fin de retirar el exceso de sales, se cambió el buffer en el que se encontraba la proteína, dializando dos tubos de 15 ml de muestra. Se utilizó membrana de diálisis SnakeSkin de 3.5 kDa de tamaño de poro y 16 mm de diámetro (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). Dentro de la membrana se vertieron 15 ml de la proteína en buffer fosfato 160 mM + NaCl 300 mM, se sellaron ambos extremos de la membrana y ésta se ubicó en un vaso de precipitados con un volumen 100 veces mayor de buffer PBS 0.5X pH 7.4. El vaso se colocó a 4°C con agitación magnética constante. El buffer PBS 0.5X pH 7.4 se cambió cada seis horas tres veces. El contenido dentro de la membrana de diálisis fue recuperado 6 horas después del último cambio de medio (F. Ahsan et al., 2018).

El proceso de diálisis se realizó dos veces para obtener una cantidad suficiente para el proceso de estandarización de síntesis de NPs. El volumen dializado se esterilizó por filtro de 0.22  $\mu\text{m}$ , y se dispensó en microtubos estériles. La concentración de proteínas totales se cuantificó por el método BCA.

## **Evaluación de la actividad biológica de rhIFN $\alpha$ -2b**

### ***Evaluación de la actividad antiviral***

Para determinar la actividad antiviral del rhIFN $\alpha$ -2b, se utilizó el método de reducción del efecto citopático (CPE) producido por el virus Mengo en células HEp-2 (carcinoma laríngeo humano, ATCC<sup>®</sup> CCL-23<sup>™</sup>). La comparación de la inhibición del CPE entre el rhIFN $\alpha$ -2b y una preparación de referencia estándar (IFN $\alpha$ -2b STD) con potencia conocida en unidades internacionales (UI) permitió determinar la potencia del rhIFN $\alpha$ -2b (Pestka & Baron, 1981). Se sembraron células HEp-2 en una placa de 96 pocillos a una concentración inicial de  $1.5 \times 10^5$  células/ml (15000 células por pocillo) en medio de crecimiento (DMEM + 5 % SFB), colocando 100  $\mu\text{l}$  por pocillo, y se incubó por 24 horas en condiciones de cultivo (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Finalizado este tiempo, se reemplazó el medio en cada pocillo por 100  $\mu\text{l}$  de medio de titulación (DMEM + 2 % (v/v) SFB) en los controles de células y controles de virus, y 50  $\mu\text{l}$  de medio de titulación en el resto de los pocillos. Luego se añadieron por duplicado 50  $\mu\text{l}$  de las diluciones del rhIFN $\alpha$ -2b (10 diluciones 1/5, desde la sexta hasta la decimoquinta) y del IFN $\alpha$ -2b STD con una potencia inicial asignada de 12000 unidades internacionales por ml (UI/ml) (10 diluciones) preparados en medio de titulación en los pocillos respectivos. Se incubó por 24 horas en condiciones de cultivo.

Después de la incubación, se retiró el medio de cada pocillo y a cada uno a excepción de los controles de células, se añadieron 100 µl de una dilución de virus Mengo con una MOI de 0.5, preparada en medio de titulación. En los controles de células se agregaron 100 µl de medio de titulación. Se incubó por 18-20 horas en condiciones de cultivo, hasta observar el 100% del efecto citopático en los controles de virus y 100% de protección en los controles de células. Al llegar a este punto, se realizó una tinción con cristal violeta (cristal violeta al 2% (w/v) en metanol al 20% (v/v)). Al finalizar se realizó la lectura de la placa a 590 nm en el espectrofotómetro SpectroStar Nano (BMG LABTECH, Alemania).

### ***Evaluación de la actividad antiproliferativa***

El efecto antiproliferativo dependiente de la dosis del rhIFN $\alpha$ -2b se determinó en la línea celular HeLa (ATCC<sup>®</sup> CCL-2<sup>™</sup>) (Jing, Cervený, Yang, & He, 2004). Las células HeLa fueron sembradas en una placa de 96 pocillos a una concentración inicial de  $5 \times 10^4$  células/ml (5000 células por pocillo) en medio DMEM + 10 % SFB, añadiendo 100 µl en cada pocillo, y se incubó por 24 horas en condiciones de cultivo. Luego, se añadieron 100 µl de las diluciones de la muestra preparadas en medio de titulación (DMEM + 1 % (v/v) SFB) en los respectivos pocillos (una dilución  $\frac{1}{4}$  de la muestra, y a partir de ésta, siete diluciones  $\frac{1}{2}$ ). En los controles de células se agregaron 100 µl de medio de titulación. Se incubó por 72 horas en condiciones de cultivo, sin aspirar el medio.

Al finalizar el período de incubación, se evaluó la viabilidad celular mediante el ensayo con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Los cristales de formazán se solubilizaron con isopropanol, agitando la placa durante 10 minutos a 100 rpm, que se leyó a 562 nm.

## **Encapsulación de rhIFN $\alpha$ -2b en CS-NPs**

### ***Estandarización de la síntesis de CS-NPs blanco***

Se preparó una solución de LMWC al 1% en ácido acético al 0.5%, agitando durante la noche a 600 rpm a temperatura ambiente. Se añadió igual volumen de etanol absoluto (EtOH) al polímero (etanol 50% v/v). Esta solución fue homogenizada y dejada en reposo hasta que desaparecieron las burbujas (Abyadeh, Aghajani, Mahmoudabad, & Amani, 2019). A continuación, se cargó en una jeringa de 10 ml (Nipro Europe Group Companies, Bélgica), y ésta se colocó en el equipo de *electrospray Professional Lab Device* (DOXA Microfluidics, España). Se fijó el flujo y se varió la diferencia de voltaje hasta observar que el cono de Taylor se formaba de manera correcta. El material sintetizado fue recolectado con ayuda de un pincel, del colector plano recubierto con papel metálico, y almacenado en un microtubo estéril. El material obtenido fue analizado por microscopía electrónica de barrido (SEM) en el Centro de Nanociencia y Nanotecnología (CENCINAT) de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.

### ***Estandarización de la síntesis de CS-NPs con rhIFN $\alpha$ -2b***

Se preparó una solución que contenía 14 ml de LMWC 1% (w/v) disuelto en ácido acético al 0.5% (v/v), 2 ml de rhIFN $\alpha$ -2b en PBS 0.5X, y 9.5 ml de EtOH. Primero se homogenizó la proteína con la solución polimérica, antes de añadir el etanol. La solución fue homogenizada mediante agitación suave y dejada en reposo hasta que desaparecieron las burbujas (Abyadeh et al., 2019). A continuación, se cargó en una jeringa de 20 ml (Beckton Dickinson, EE. UU.), y ésta se colocó en el equipo de *electrospray Professional Lab Device* (DOXA Microfluidics, España). Se fijó el flujo y se varió la diferencia de voltaje hasta observar que el cono de Taylor se formaba de

manera correcta. El material sintetizado fue recolectado con ayuda de un pincel, del colector plano recubierto con papel metálico, y almacenado en un microtubo estéril. El material obtenido fue analizado por microscopía electrónica de transmisión (TEM), de barrido (SEM), y de transmisión y barrido (STEM) en el Centro de Nanociencia y Nanotecnología (CENCINAT) de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.

### **Evaluación de los sistemas de liberación de IFN $\alpha$ y su relación con la actividad biológica.**

Se investigó acerca de los sistemas de liberación de IFN $\alpha$  en nanoformulaciones reportadas hasta la fecha, y la forma en la que la cinética puede afectar la actividad biológica de la molécula. Para este fin, se realizó una búsqueda de reportes de investigaciones y artículos de revisión en las bases de datos *PubMed*, *Springer Link* y *ScienceDirect*. La información recabada permitió redactar la revisión bibliográfica de este apartado. Esta descripción representó una aproximación teórica de la cinética de liberación y actividad biológica que podrían manifestar las NPs sintetizadas en la presente investigación.

### **Análisis estadístico de los ensayos de actividad biológica**

Los resultados de la reducción del CPE se ajustaron a una curva dosis-respuesta sigmoidea, al graficar el logaritmo de los recíprocos de las diluciones de IFN $\alpha$  versus la absorbancia de la tinción. Por ello, se utilizó una regresión logística de cuatro parámetros, como indica la sección 5.3. sobre el análisis estadístico de resultados de ensayos biológicos de la Farmacopea Europea 6.0, para calcular la concentración media máxima efectiva (EC<sub>50</sub>) observada de las diluciones del rhIFN $\alpha$ -2b y del IFN $\alpha$ -2b STD, medida en unidades de laboratorio por ml (UL/ml). Para que el ensayo sea

considerado válido, fue necesario verificar que las curvas del IFN $\alpha$ -2b STD e rhIFN $\alpha$ -2b eran paralelas, es decir que no existían diferencias significativas entre sus factores de pendiente, niveles máximos, y niveles mínimos de respuesta, con un valor p mayor o igual a 0.05 (Junzhi Wang et al., 2011). Estos análisis se realizaron en el software GraphPad Prism 9 (GraphPad Prism, EE. UU.).

La EC<sub>50</sub> del rhIFN $\alpha$ -2b, correspondiente a su título o potencia en UI/ml, fue calculada a partir de la EC<sub>50</sub> en UL/ml, obtenida en la regresión logística, utilizando la siguiente ecuación de corrección:

$$EC_{50} \text{ rhIFN}\alpha 2b \left( \frac{UI}{ml} \right) = \frac{EC_{50} \text{ rhIFN}\alpha 2b \text{ observado} \left( \frac{UL}{ml} \right)}{EC_{50} \text{ IFN}\alpha 2b \text{ observado} \left( \frac{UL}{ml} \right)} * EC_{50} \text{ asignado al IFN}\alpha 2b \text{ STD} \left( \frac{UI}{ml} \right)$$

tomando en cuenta que el EC<sub>50</sub> asignado al IFN $\alpha$ -2b STD tenía un valor de 12000 UI/ml.

Los porcentajes de viabilidad celular del ensayo antiproliferativo se graficaron como el promedio  $\pm$  desviación estándar de cada tratamiento. Primero se verificó que los datos obtenidos se ajustaban a una distribución normal realizando una prueba Shapiro-Wilk, para luego hacer un ANOVA de doble vía y prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Los símbolos empleados para denotar los resultados con significancia estadística fueron: \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 y \*\*\*\*p<0,0001. Un valor p < 0.05 se consideró significativo para los análisis con ANOVA (Jing et al., 2004). Para estos análisis se utilizó el software GraphPad Prism 9 (GraphPad Prism, EE. UU.).

## Capítulo 4

### Resultados

Este trabajo estuvo dirigido a la obtención de una formulación de CS-NPs que encapsulen al rhIFN $\alpha$ -2b utilizando la técnica de *electrospray*. Para este fin, fue necesario producir y purificar la proteína rhIFN $\alpha$ -2b en células de *E. coli* transformadas con el vector que expresa la citoquina, de acuerdo con los protocolos establecidos en el Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos de la Universidad de Concepción. Posterior a esto, se evaluó la actividad antiviral y antiproliferativa de la molécula obtenida, y se procedió a encapsularla en CS-NPs utilizando el método de *electrospray*. El tamaño y la morfología de las partículas obtenidas fueron determinadas por microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión y barrido (STEM). Por último, se evaluó el transporte y captación celular de las NPs, así como la liberación del principio activo reportada en la literatura, y el impacto que dicha cinética tiene en su actividad biológica.

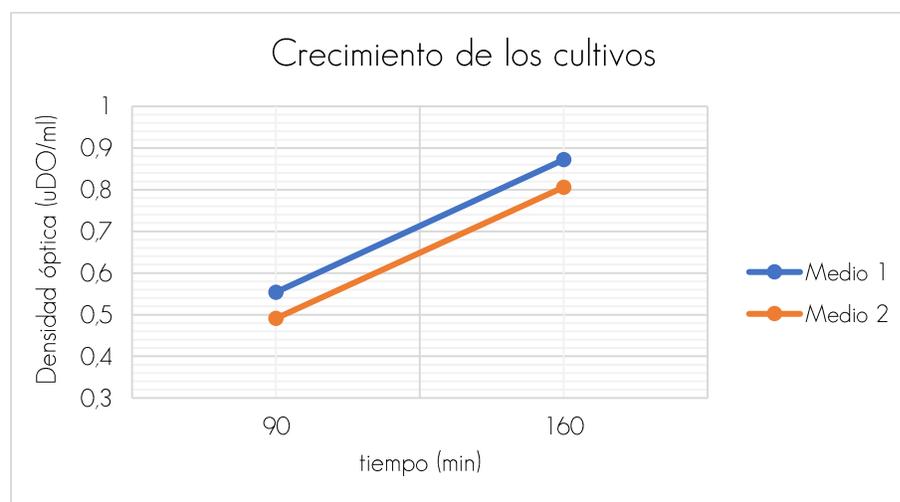
#### Producción de rhIFN $\alpha$ -2b en *E. coli*

El rhIFN $\alpha$ -2b fue expresado en el sistema *SHuffle*<sup>®</sup> T7 Express Competent *E. coli* transformada con el vector plasmídico pET22b(+)-hIFN $\alpha$ -2b. Un vial de esta cepa fue donado por el Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos de la Universidad de Concepción. El vial fue descongelado aplicando calor húmedo a 25 °C y agitando con suavidad para minimizar la muerte bacteriana debido al estrés térmico. Una muestra fue sembrada en agar LB, que se incubó a 30 °C con la finalidad de estimular la salida de las células de su fase de latencia. A partir de la placa se obtuvo el inóculo utilizado en la fermentación. Se estableció un cultivo total de 2.5 litros en diferentes medios TB, incubados a 30 °C en agitación constante durante 160 minutos, tiempo en el cual el

crecimiento bacteriano alcanzó los valores de densidad óptica necesarios para iniciar la inducción con IPTG de la expresión del rhIFN $\alpha$ -2b (0.8-0.9 uDO/ml) (figura 4). Al finalizar las seis horas de inducción, la biomasa de los medios de cultivo fue unificada para la purificación del rhIFN $\alpha$ -2b, obteniéndose un total de 13.32 g en peso húmedo.

#### Figura 4

*Crecimiento de los cultivos en función del tiempo.*



*Nota.* Fuente: Elaborado por Carlos Villacís.

El resultado de la fermentación de 2.5 litros a las condiciones establecidas por el Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos, para la producción de rhIFN $\alpha$ , fueron 13.32 g en peso húmedo de biomasa, en la cual estaba contenida la proteína expresada.

#### Purificación de rhIFN $\alpha$ -2b

La molécula producida debió ser recuperada de la biomasa unificada mediante un paso de lisis celular, que se complementó con una posterior remoción por ultrafiltración de los restos celulares generados en la lisis. Se emplearon varias

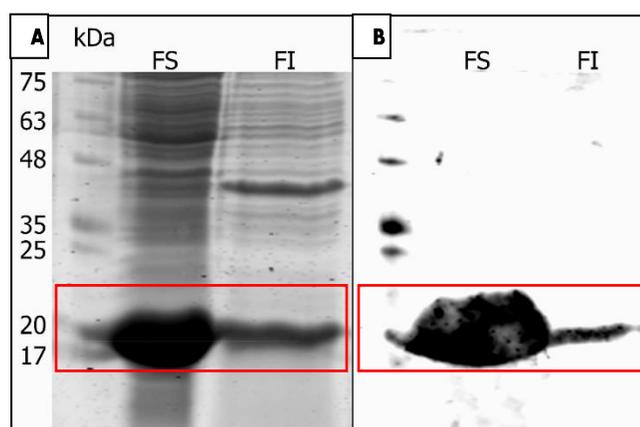
cromatografías con la finalidad de retirar la mayor cantidad de proteínas contaminantes y obtener un rhIFN $\alpha$ -2b de alta pureza, que es imperativa en su uso como agente terapéutico.

### ***Ruptura de la biomasa***

La homogenización líquida por prensa francesa de la biomasa, resuspendida en 133 ml de agua destilada, se realizó con el objetivo de liberar al rhIFN $\alpha$ -2b que se encontraba localizado en el espacio periplasmático de las bacterias. En este proceso se obtuvieron dos fracciones: 130 ml de sobrenadante correspondientes a la fracción soluble, y el pellet respectivo a la fracción insoluble, que se resuspendió en igual volumen de agua destilada. Mediante SDS-PAGE y Western Blot se logró determinar que la mayor parte de proteína de interés, correspondiente a la banda de 19 kDa, se encontraba en el sobrenadante (figura 5).

### **Figura 5**

*SDS-PAGE y Western Blot de las fracciones obtenidas en la ruptura celular.*



*Nota.* **A.** SDS-PAGE. **B.** Western Blot. Carril 1: PM. Carril 2: Fracción soluble (FS).

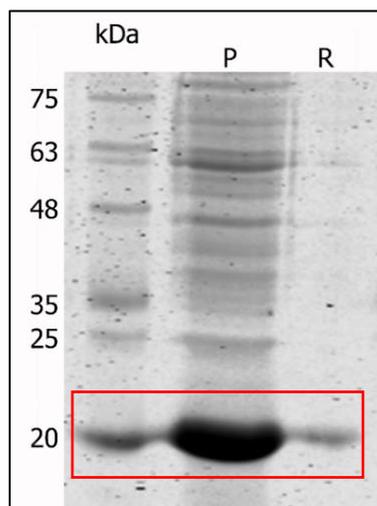
Carril 3: Fracción insoluble (FI). Fuente: Elaborado por Carlos Villacís.

### ***Ultrafiltración de la fracción soluble***

El sobrenadante de la ruptura celular, que contenía el rhIFN $\alpha$ -2b, debió ser clarificado mediante ultrafiltración tangencial a través de una membrana con tamaño de poro de 100 kDa, con la finalidad de remover los restos celulares. Del procedimiento resultaron dos fracciones: filtrado y retenido. La SDS-PAGE de estos elementos reveló que la citoquina estaba contenida en el filtrado (figura 6), que fue utilizado como material de entrada en el siguiente paso de purificación.

### **Figura 6**

*SDS-PAGE de las fracciones obtenidas en la ultrafiltración.*



*Nota.* Carril 1: PM. Carril 2: Filtrado (P). Carril 3: Retenido (R). Fuente: Elaborado por Carlos Villacís.

Se consideraron tres pasos de purificación con la finalidad de recuperar el rhIFN $\alpha$ -2b con el mayor grado de pureza. El primer paso, de clarificación de la muestra, se realizó por cromatografía de modo mixto; la concentración de la proteína correspondiente al segundo paso fue efectuada mediante cromatografía de intercambio

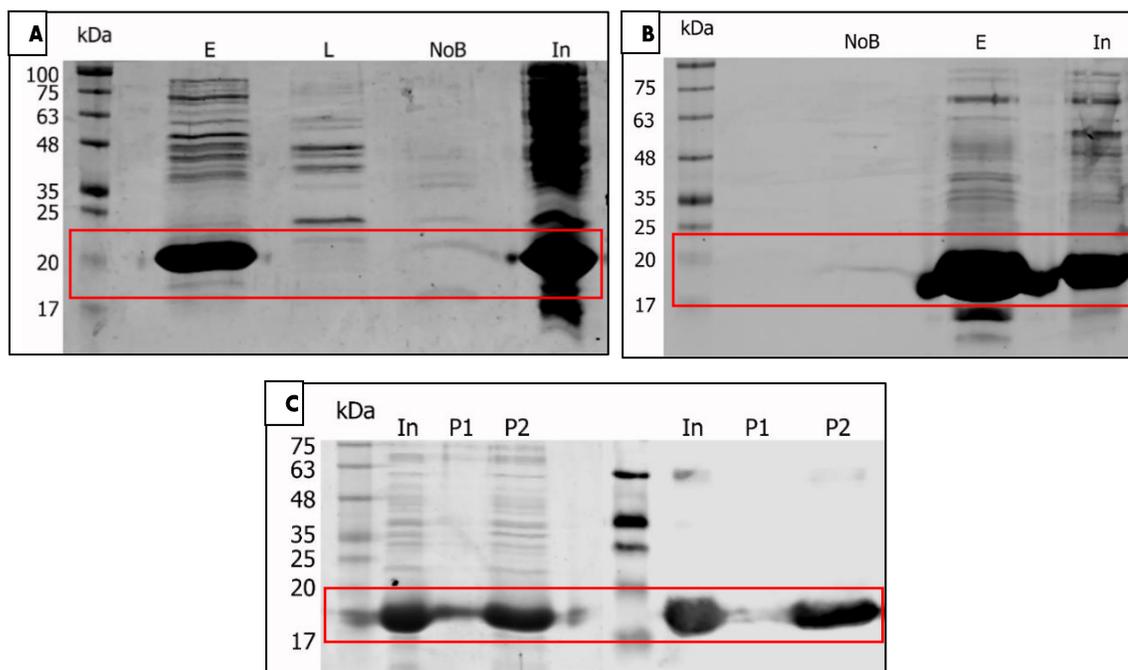
iónico; y para la purificación final, considerando el tamaño bajo del IFN $\alpha$ , se utilizó una cromatografía de exclusión molecular. Esta combinación ha sido establecida en estudios previos en base a su rendimiento y su costo-efectividad.

### ***Cromatografía de modo mixto (MMC)***

En esta cromatografía se emplearon dos modos de captura del rhIFN $\alpha$ -2b: interacción hidrofóbica e intercambio aniónico, debido a los dominios hidrofóbicos presentes en la proteína, y por su carga eléctrica negativa (punto isoeléctrico de 5.99) en las condiciones del filtrado (pH 7.5). El resultado de la purificación fueron dos picos de absorbancia: el primero correspondió a las proteínas del lavado, y el segundo, de mayor intensidad, consistió en las proteínas recuperadas en la elución. El SDS-PAGE mostró que varios contaminantes fueron retirados en el lavado, y en menor proporción en el no unido (elementos con baja afinidad a la columna), mientras que en la elución se recuperó el rhIFN $\alpha$ -2b, junto con otros componentes no deseados (figura 7A). Cabe destacar que la proteína se eluyó al disminuir el pH del medio (4.3), de manera que se interrumpió la atracción electrostática entre la columna y la molécula, esta vez con carga positiva por efecto del cambio de pH.

## Figura 7

*Presencia de rhIFN $\alpha$ -2b en las diferentes fracciones obtenidas en las cromatografías.*



*Nota.* **A.** SDS-PAGE de MMC. Carril 1: PM. Carril 2: Elución (E). Carril 3: Lavado (L). Carril 4: No unido (NoB). Carril 5: Entrada (In). **B.** SDS-PAGE de IEX. Carril 1: PM. Carril 2: No unido (NoB). Carril 3: Elución (E). Carril 4: Entrada (In). **C.** SDS-PAGE (izquierda) y Western Blot (derecha) de SEC. Carril 1: PM. Carril 2: Entrada (In). Carril 3: Primer pico de absorbancia (P1). Carril 4: Segundo pico de absorbancia (P2). Fuente: Elaborado por Carlos Villacís.

### ***Cromatografía de intercambio iónico (IEX)***

En el segundo paso de purificación se utilizó una cromatografía de intercambio catiónico, ya que en este punto el rhIFN $\alpha$ -2b tenía carga positiva a consecuencia de la elución de la MMC. En este proceso no fue necesario el lavado de la columna, porque

una gran parte de los contaminantes fueron retirados con base en su mayor afinidad que la molécula purificada, por lo tanto quedaron retenidos en la matriz aún después de la elución, de manera que solo se obtuvo la fracción de elución. A través de SDS-PAGE se determinó que ciertos contaminantes fueron retirados al tener baja afinidad con la columna (no unido), en tanto que la proteína de interés fue recuperada en la elución (figura 7B).

### ***Concentración de la proteína***

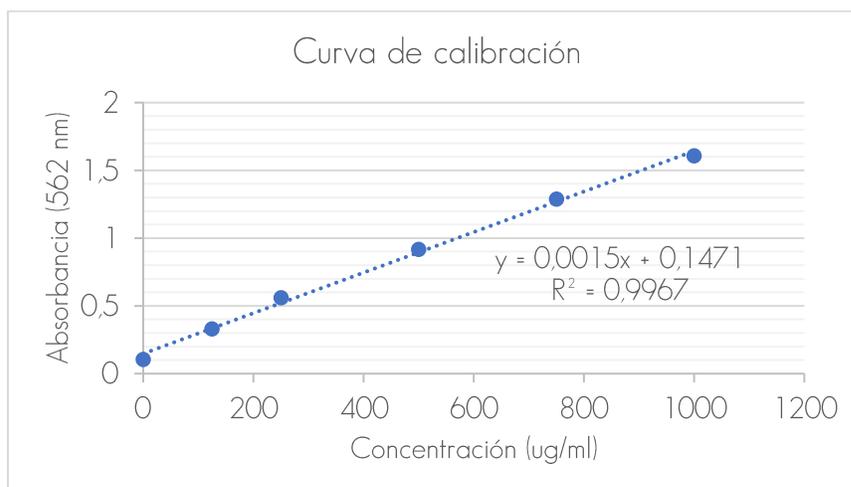
La proteína fue concentrada para reducir su volumen, pues la columna de la cromatografía de exclusión molecular solo admite una entrada de 5 ml. Este procedimiento se realizó filtrando la elución de la IEX a través de una membrana de 5 kDa, y se obtuvieron dos fracciones: filtrado y retenido. La concentración de proteínas totales en el retenido, donde se encontraba el rhIFN $\alpha$ -2b, fue cuantificada mediante el método BCA. La figura 8 muestra la curva de calibración, a partir de la cual se obtuvo la siguiente ecuación aplicando una regresión lineal:

$$y = 0.0015x + 0.1471$$

donde  $y$  fue la absorbancia y la concentración de la proteína en  $\mu\text{g/ml}$  correspondió a  $x$ , con un coeficiente de determinación  $R^2 = 0.9967$ .

**Figura 8**

Curva de calibración para el ensayo BCA luego de la concentración.



Nota. Fuente: Elaborado por Carlos Villacís.

Con esta ecuación de regresión se calculó una concentración de proteínas totales de 8.55 mg/ml.

### **Cromatografía de exclusión molecular (SEC)**

Se consideró un paso de purificación final que permitió la remoción de varios contaminantes, con el fin de obtener un producto de alta pureza. Esta cromatografía consistió en separar el rhIFN $\alpha$ -2b de las proteínas no deseadas por su tamaño, utilizando una columna de exclusión molecular. Es así como se apreciaron dos picos de absorbancia, cuyos contenidos fueron verificados por SDS-PAGE y *Western Blot*. Este análisis mostró que el primer pico correspondió con varios contaminantes, mientras que en el segundo pico se encontraba la proteína de interés, junto con otros componentes (figura 7C). Los contaminantes fueron descartados, y se procedió a calcular la pureza

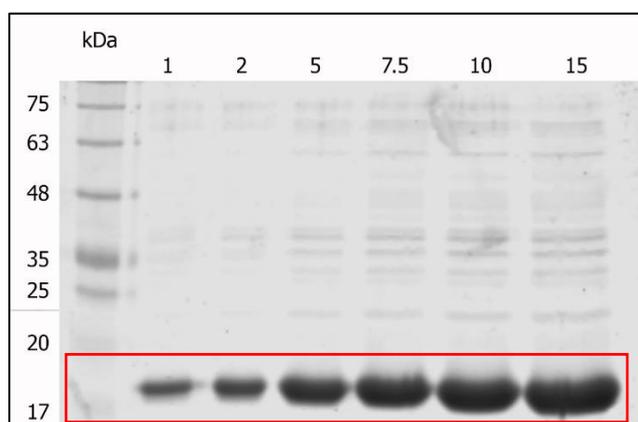
final de la citoquina, presente en la fracción correspondiente al segundo pico de absorbancia.

### ***Determinación de la pureza de rhIFN $\alpha$ -2b***

Con el objeto de precisar la pureza del rhIFN $\alpha$ -2b producido, se realizó un ensayo de densitometría en gel, utilizando la SDS-PAGE para separar las proteínas (observadas como bandas), y calcular la intensidad relativa de cada banda respecto a la intensidad total. En primer lugar se requería determinar la banda correspondiente al rhIFN $\alpha$ -2b que presentaba una intensidad máxima sin sobresaturación, pues una banda sobresaturada conllevaría a una lectura errónea de la intensidad, y en consecuencia, una valoración imprecisa de la pureza. Para ello se corrió el gel con diferentes volúmenes de la muestra que contenía la proteína (figura 9).

### **Figura 9**

*SDS-PAGE de la proteína purificada a diferentes volúmenes cargados.*



*Nota.* Fuente: Elaborado por Carlos Villacís.

Para la evaluación se utilizó el carril con 5  $\mu$ l de muestra, a partir del cual se determinó una pureza del rhIFN $\alpha$ -2b de 89.14%. A continuación, se volvió a cuantificar

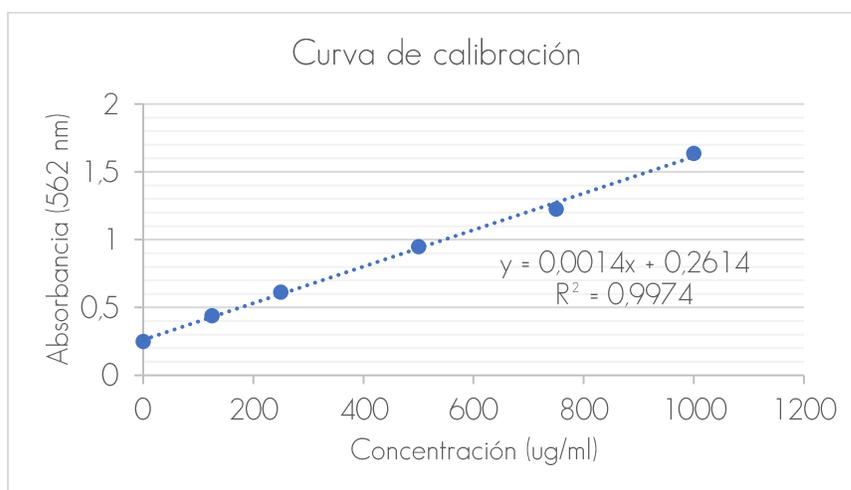
la concentración de proteínas por el método BCA, esta vez para calcular la cantidad de rhIFN $\alpha$ -2b en lugar del contenido total de proteínas. En la figura 10 se puede apreciar la curva de calibración utilizada para calcular la ecuación obtenida por regresión lineal:

$$y = 0.0014x + 0.2614$$

donde  $y$  fue la absorbancia y la concentración de la proteína en  $\mu\text{g/ml}$  correspondió a  $x$ , con un coeficiente de determinación  $R^2 = 0.9974$ .

### Figura 10

*Curva de calibración para el ensayo BCA posterior a la determinación de la pureza.*



*Nota.* Fuente: Elaborado por Carlos Villacís.

A partir de esta ecuación de regresión se calculó una concentración de proteínas totales de 912.58  $\mu\text{g/ml}$ . Considerando la pureza del 89.14%, se determinó que la concentración de rhIFN $\alpha$ -2b fue de  $(912.58 \mu\text{g/ml}) * (0.8914) = 813.47 \mu\text{g/ml}$ .

El buffer de elución de SEC, en el que se encontraba el rhIFN $\alpha$ -2b, fue reemplazado mediante diálisis por buffer PBS 0.5X pH 7.4, para retirar el exceso de

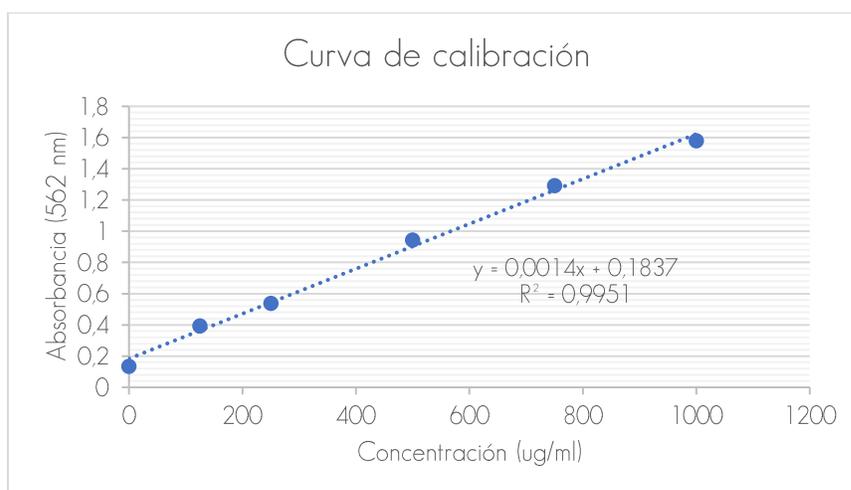
sales que podrían interferir en los ensayos posteriores. La molécula fue esterilizada por filtración a través de una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ , y su concentración fue cuantificada por BCA, a fin de verificar si existió pérdida de material durante la esterilización. La figura 11 indica la curva de calibración, a partir de la cual se obtuvo la ecuación:

$$y = 0.0014x + 0.1837$$

donde  $y$  fue la absorbancia y  $x$  fue la concentración de la proteína en  $\mu\text{g/ml}$ , con un coeficiente de determinación  $R^2 = 0.9951$ .

### Figura 11

*Curva de calibración para el ensayo BCA luego de la filtración y diálisis.*



*Nota.* Fuente: Elaborado por Carlos Villacís.

Con la ecuación de regresión se calculó una concentración de proteínas totales de 787.86  $\mu\text{g/ml}$ . Tomando en cuenta la pureza del 89.14%, se determinó que la concentración de rhIFN $\alpha$ -2b fue de  $(787.86 \mu\text{g/ml}) * (0.8914) = 702.3 \mu\text{g/ml}$ . Durante los procesos de diálisis y esterilización se perdió un 13.67 % de proteína (111.17  $\mu\text{g/ml}$ ).

A través de los diferentes pasos de purificación, se lograron separar los restos celulares y proteínas contaminantes del rhIFN $\alpha$ -2b, obteniéndose un lote con una concentración de 702.3  $\mu$ g/ml y una pureza de 89.14%.

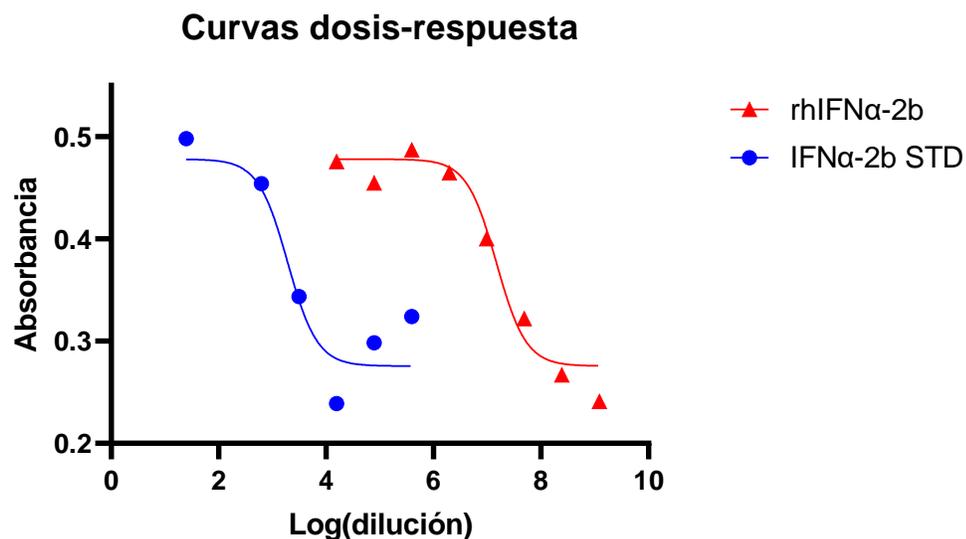
### **Evaluación de la actividad biológica de rhIFN $\alpha$ -2b**

#### ***Evaluación de la actividad antiviral***

Se cuantificó la reducción del CPE producido por las preparaciones de IFN $\alpha$  en células HEp-2 expuestas al virus Mengo con el fin de determinar la actividad antiviral del rhIFN $\alpha$ -2b producido. Se prepararon diluciones 1/5 del material de referencia y de la muestra, utilizadas en el tratamiento de las células para inducir su estado antiviral. Las gráficas del logaritmo de los recíprocos de las diluciones contra las absorbancias se ajustaron a curvas dosis-respuesta sigmoideas para ambas preparaciones (figura 12). Mediante el análisis logístico de cuatro parámetros se generaron las curvas de regresión, y se verificó que la curva del IFN $\alpha$ -2b STD y la del rhIFN $\alpha$ -2b eran paralelas, al determinarse que los niveles mínimos y máximos de respuesta, así como el factor de pendiente, no eran diferentes en ambas curvas (tabla 2), de manera que el ensayo era válido (valor  $p = 0.4456$ ).

Figura 12

Curvas dosis-respuesta del IFN $\alpha$ -2b STD y del rhIFN $\alpha$ -2b.



Nota. Fuente: Elaborado por Carlos Villacís.

Tabla 2

Resumen estadístico de la regresión logística de 4 parámetros.

Parámetros	IFN $\alpha$ -2b STD	rhIFN $\alpha$ -2b	Análisis global (ambas curvas)
Nivel mínimo de respuesta	0.2884	0.2395	0.2756
Nivel máximo de respuesta	0.4946	0.4750	0.4779
Factor de pendiente	-1.7750	-0.9683	-1.5770
EC <sub>50</sub> observada (UL/ml)	1537	2.49*10 <sup>7</sup>	
R <sup>2</sup>	0.8912	0.9639	0.9356
Valor p			0.4456

Nota. Fuente: Elaborado por Carlos Villacís.

La comparación de las respuestas observadas se efectuó mediante el análisis de regresión, que determinó el valor de las  $EC_{50}$  observadas para las dos preparaciones (tabla 3). Estos títulos, ubicados en el segmento lineal de las curvas, fueron utilizados para la cuantificación de la  $EC_{50}$  del rhIFN $\alpha$ -2b. La potencia de la citoquina producida y purificada, calculada con el valor obtenido en la regresión, fue de  $1.94 \cdot 10^8$  UI/ml, mientras que la actividad específica, determinada considerando la concentración de la proteína, fue de  $(1.94 \cdot 10^8 \text{ UI/ml}) / (0.702 \text{ mg/ml}) = 2.77 \cdot 10^8$  UI/mg.

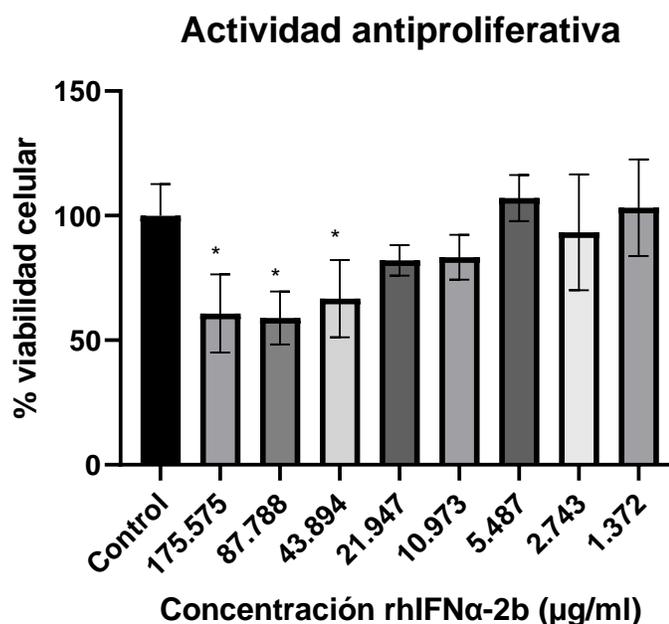
La actividad antiviral asignada al rhIFN $\alpha$ -2b, cuantificada mediante el ensayo de reducción del CPE provocado por virus Mengo en células HEp-2, fue de  $1.94 \cdot 10^8$  UI/ml, y su actividad específica fue de  $2.77 \cdot 10^8$  UI/mg, similar a la reportada para el Intron-A ( $2.6 \cdot 10^8$  UI/mg).

### ***Evaluación de la actividad antiproliferativa***

Esta actividad del rhIFN $\alpha$ -2b fue estimada como el porcentaje de muerte celular, provocada en las células tratadas con la citoquina. Las absorbancias obtenidas en la tinción fueron normalizadas para expresarlas como porcentaje de viabilidad celular. Se comprobó, con la prueba Shapiro-Wilk, que los datos normalizados de absorbancia se ajustaban a una distribución normal. Una vez verificada la normalidad, se realizó un ANOVA y una prueba de comparaciones múltiples entre las diferentes concentraciones para verificar cuáles disminuían la viabilidad celular de forma significativa. En base a estos análisis estadísticos se encontró que tres concentraciones de rhIFN $\alpha$ -2b redujeron la viabilidad de las células de la línea HeLa de forma significativa (figura 13): 175.575  $\mu$ g/ml, 87.788  $\mu$ g/ml, y 43.894  $\mu$ g/ml.

Figura 13

Comparación de la viabilidad celular en cada tratamiento con rhIFN $\alpha$ -2b.



Nota. El símbolo \* señala las concentraciones que se diferencian de forma significativa.

Fuente: Elaborado por Carlos Villacís.

Se calculó un 41.07% de muerte celular a una concentración de 87.788  $\mu\text{g/ml}$  (dilución  $1/2^3$ ), de manera que el título antiproliferativo de la muestra, definido como el inverso de la dilución a la cual se produjo un 50% de muerte celular, fue de 43.89  $\mu\text{g/ml}$ .

### Selección de parámetros para la síntesis de NPs

Durante la síntesis de NPs mediante el método de *electrospray* pueden aparecer distintos tipos de chorro a partir del cono de Taylor: estable, goteo, pulsos de solución, y menisco ramificado, aunque no todos permiten la obtención de NPs (Abyadeh et al., 2017). De hecho, la formación de un cono de Taylor y chorro estables es crucial para una producción adecuada de partículas. Por esta razón, los parámetros de

funcionamiento del equipo para la síntesis de las NPs (blanco y con rhIFN $\alpha$ -2b encapsulado) se fijaron en los valores a los cuales se observó, con ayuda de una cámara incorporada en el equipo, que el cono de Taylor y el chorro se mantenían estables (figura 14). Las configuraciones del equipo utilizadas para la síntesis de CS-NPs blanco y CS-NPs con rhIFN $\alpha$ -2b encapsulado se indican en la tabla 3.

**Tabla 3**

*Configuraciones del equipo utilizadas en la síntesis de NPs.*

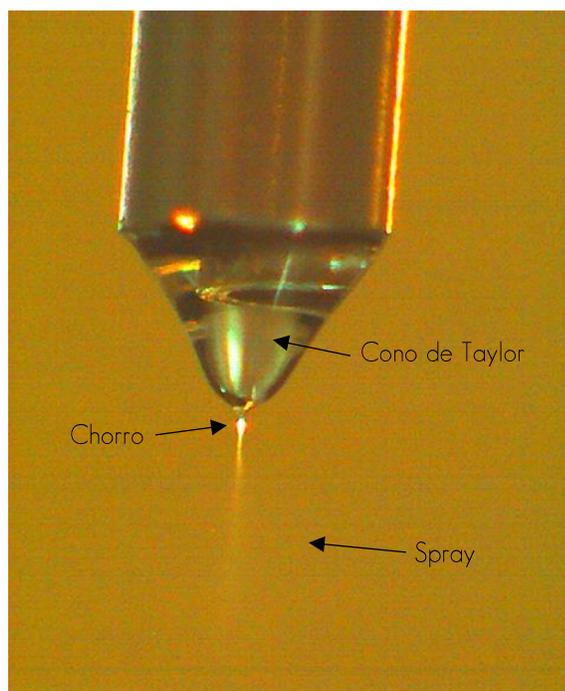
<b>Parámetro</b>	<b>CS-NPs blanco</b>	<b>CS-NPs con rhIFN<math>\alpha</math>-2b</b>
Flujo de salida del polímero (ml/h)	0.5	0.5
Diferencia de voltaje en el inyector (kV)	15.72	19.24
Diferencia de voltaje en el colector (kV)	10.18	23.84

*Nota.* Fuente: Elaborado por Carlos Villacís.

El EtOH fue añadido para reducir la conductividad y aumentar la viscosidad de las soluciones de CS, volviéndolas más apropiadas para la formación de NPs mediante el proceso de *electrospray* (Sreekumar, Lemke, Moerschbacher, Torres-Giner, & Lagaron, 2017). Esta adición conllevó a la dilución de las soluciones poliméricas, de manera que la concentración final de CS resultó ser de 0.5% (w/v) en las partículas blanco, y de 0.55% (w/v) en las partículas con la molécula encapsulada.

**Figura 14**

*Cono de Taylor formado durante la síntesis de CS-NPs.*

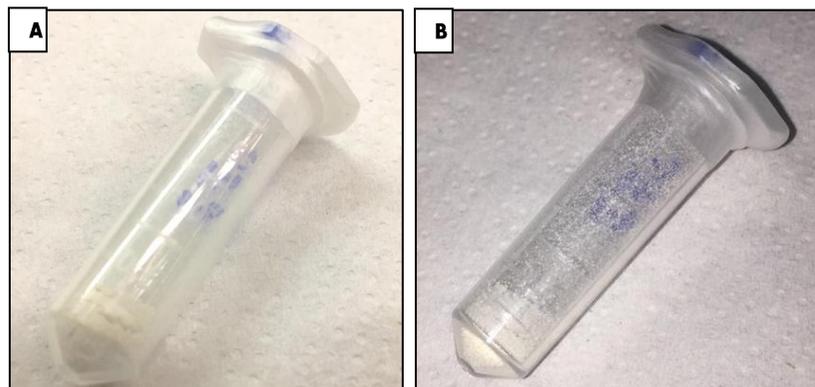


*Nota.* Fuente: Elaborado por Carlos Villacís.

El producto de la síntesis de NPs por la técnica de *electrospray* en general es seco, a menos que se coloque un recipiente con líquido en el colector para que las partículas queden en suspensión. Escogimos la recolección en seco tanto para las CS-NPs blanco como para las que encapsulaban el rhIFN $\alpha$ -2b, con el objeto de facilitar su empaquetamiento, almacenamiento y transporte. Los productos de la síntesis de las CS-NPs blanco (figura 15A), y de las CS-NPs con rhIFN $\alpha$ -2b encapsulado (figura 15B) se observaron de forma macroscópica en forma de un polvo blanco, que fueron recolectados en diferentes microtubos estériles, y empaquetados para su posterior observación por microscopía.

## Figura 15

*Productos de la síntesis de CS-NPs.*



*Nota.* **A.** CS-NPs blanco. **B.** CS-NPs con rhIFN $\alpha$ -2b. Fuente: Elaborado por Carlos Villacís.

### **Análisis de las NPs mediante microscopía electrónica**

La determinación de la distribución de tamaño y morfología de las CS-NPs con rhIFN $\alpha$ -2b encapsulado se realizó por microscopía electrónica de barrido (SEM), y de transmisión y barrido (STEM). Estos parámetros deben ser caracterizados porque influyen en el transporte y captación celular de las NPs, y por ende, en la eficacia del fármaco encapsulado.

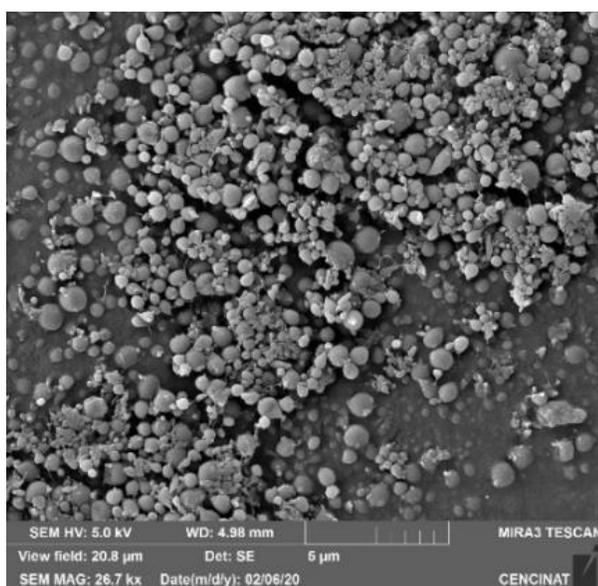
#### **CS-NPs blanco**

La observación de las NPs blanco en SEM utilizando agua destilada tipo 1 como solvente reveló que éstas tenían una morfología esférica, y un diámetro máximo de 1  $\mu$ m, aunque la mayor parte no superó los 500 nm (figura 16). No se determinó el diámetro promedio en base a un número representativo de mediciones, pues solo se

necesitaba comprobar que las partículas de CS sintetizadas por *electrospray* eran esféricas y nanométricas.

### Figura 16

*Micrografía SEM de las CS-NPs blanco.*



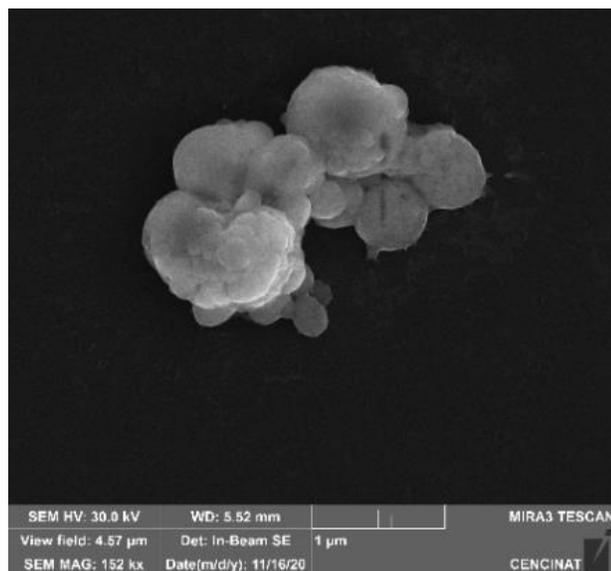
*Nota.* Fuente: CENCINAT – ESPE.

### ***CS-NPs con rhIFN $\alpha$ -2b encapsulado***

La observación en SEM utilizando agua destilada tipo 1 como solvente reveló que estas NPs presentaban morfología esférica (figura 17). También se pudo apreciar la presencia de NPs, asimismo esféricas, pero más pequeñas (figura 18, flecha roja), con un diámetro promedio de 87 nm. Además, se visualizaron ciertas partículas con forma irregular y aglomerados de CS (figura 18, flecha amarilla). Estos hallazgos sugieren que se pudieron formar modos inestables de chorro durante el proceso de síntesis.

**Figura 17**

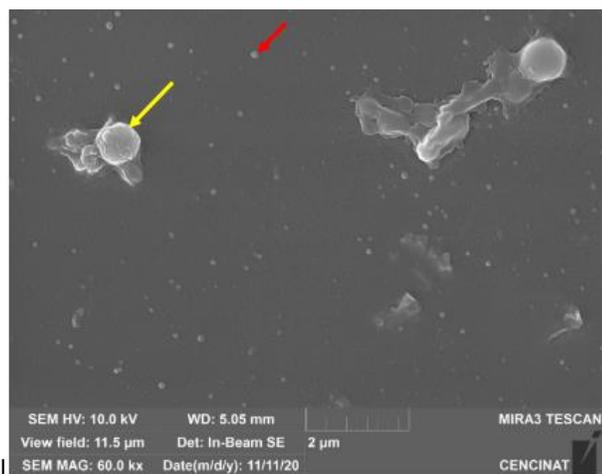
*Morfología esférica de las CS-NPs con rhIFN $\alpha$ -2b.*



*Nota.* Fuente: CENCINAT – ESPE.

**Figura 18**

*Micrografía SEM de CS-NPs pequeñas y aglomerados de CS.*

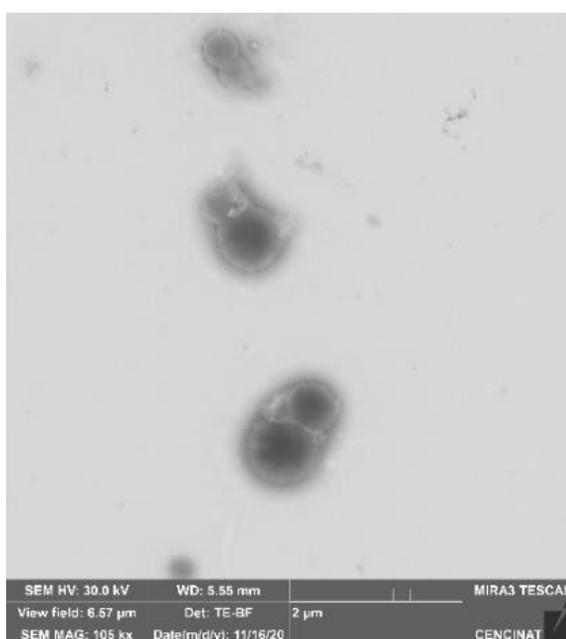


*Nota.* Fuente: CENCINAT – ESPE.

El tamaño de las NPs se determinó por STEM, para lo cual la muestra fue teñida con ácido fosfotúngstico (PTA) 1 % durante 5 segundos. Este procedimiento brindó un mayor contraste para determinar que el material sintetizado consistió en una población heterodispersa de NPs, cuyos diámetros se encontraban en el rango de 230-475 nm (figura 19), observándose con mayor frecuencia la subpoblación de NPs más grandes con un diámetro aproximado de 475 nm. Este resultado indicó que el proceso de síntesis aún puede pulirse, hasta lograr obtener una población monodispersa de NPs.

### Figura 19

*Micrografía STEM de las CS-NPs con rhIFN $\alpha$ -2b.*

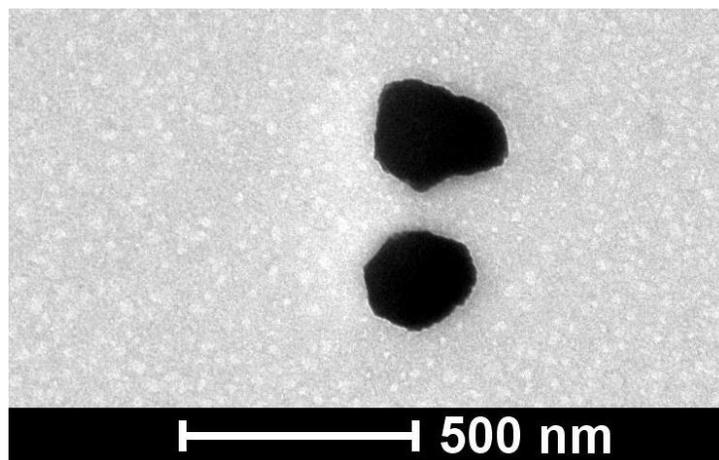


*Nota.* Fuente: CENCINAT – ESPE.

Un análisis adicional a través de la observación en el TEM permitió verificar que las NPs presentaban en efecto una morfología esférica, y un tamaño inferior a los 500 nm (figura 20).

**Figura 20**

*Micrografía TEM de las CS-NPs con rhIFN $\alpha$ -2b.*



*Nota.* Fuente: CENCINAT – ESPE.

Los resultados mostraron que las CS-NPs con rhIFN $\alpha$ -2b sintetizadas por *electrospray* conformaron una población heterodispersa de partículas esféricas con tamaños dentro del rango 230-475 nm, además de una pequeña subpoblación de NPs con un diámetro promedio de 87 nm. La concentración final del polímero en las partículas fue de 0.55%.

**Evaluación de los sistemas de liberación de IFN $\alpha$  y su relación con la actividad biológica.**

La entrada segura de las NPs a las células es crucial para alcanzar una eficacia terapéutica de alto rendimiento, mientras que el transporte exitoso de los diversos compuestos a encapsular depende de la localización de las NPs. Una completa comprensión de los mecanismos de transporte y captación celular de estas partículas, así como de la cinética de liberación del principio activo, es fundamental para diseñar

formulaciones eficientes y seguras (Behzadi et al., 2017). Presentamos una revisión sobre los sistemas reportados en la literatura para NPs con IFN $\alpha$  encapsulado, su cinética de liberación, y su relación con la actividad biológica del fármaco liberado.

Dentro de los sistemas desarrollados para el IFN $\alpha$ , la PEGilación de la molécula se estableció como sistema de protección para facilitar el transporte y reducir la eliminación del fármaco, al mejorar su farmacocinética y prolongar su vida media. Las dos formas principales moléculas pegiladas para el interferón alfa son: el de PEG-IFN $\alpha$  (Pegasys®) y el PEG-IFN- $\alpha$ 2b (Pegintron®) (Woo et al., 2017). Varios ensayos clínicos han concluido que el PEG-IFN $\alpha$  tiene una tasa de respuesta más alta que el IFN $\alpha$  estándar (Cooksley et al., 2003; H. Zhao et al., 2007), aunque la superioridad del tratamiento con PEG-IFN $\alpha$  es controvertida ya que estos estudios utilizaron dosis de IFN $\alpha$  estándar inferiores a las recomendadas (Hoofnagle & Di Bisceglie, 1997). Por otro lado, la terapia con PEG-IFN $\alpha$  no es bien tolerada bien porque los efectos adversos son comunes, y en ocasiones pueden causar una morbilidad o mortalidad significativa (Woo et al., 2017). Por esta razón, se ha investigado con gran interés la encapsulación del IFN $\alpha$ , pues este sistema brinda una matriz de protección y liberación controlada del medicamento, que puede tener menos eventos adversos asociados al tratamiento (Lembo et al., 2018).

Se han reportado estudios de encapsulación de IFN $\alpha$  desde 1989, y con el tiempo esta tecnología ha avanzado de tal manera que ha sido evaluada para su uso clínico, y comparada con otras estrategias de transporte como la PEGilación. El uso de IFN $\alpha$  encapsulados en el tratamiento de hepatitis B, hepatitis C y varios tipos de cáncer es una vía prometedora para investigación y desarrollo (Saez et al., 2012). Los primeros enfoques explorados fueron las encapsulaciones en dendrímeros y liposomas

(Jøraholmen et al., 2017), aunque su estabilidad y capacidad de carga fueron limitadas, y se ha descrito pérdida de actividad de la molécula con estos sistemas (L. Yang, Yang, Bi, & Zeng, 2006). Después se estudió la encapsulación en microesferas (Lawitz et al., 2010), pero perdió interés cuando se reportó que el IFN $\alpha$  no se liberaba por completo de las micropartículas, y que el proceso de microencapsulación ocasionaba inestabilidad en la molécula (Saez et al., 2012). De esta manera, las investigaciones se dirigieron al desarrollo de sistemas nanoencapsulados, entre las que figuran las NPs metálicas cubiertas de lisina (Aghdam et al., 2008) o acopladas a ácido hialurónico (M. Y. Lee et al., 2012), y NPs poliméricas, que tienen una mayor eficiencia de encapsulación, son biocompatibles y biodegradables (Sridhar & Ramakrishna, 2013). Los polímeros que se han utilizado para nanoencapsular el IFN $\alpha$  son el PLGA (Saez et al., 2008), PLGA/poloxámero (Sánchez et al., 2003), y CS (Imperiale et al., 2019). Ninguno de estos sistemas está aprobado para el tratamiento de alguna enfermedad, y tampoco están siendo evaluados en ensayos clínicos, pero eso no significa que no funcionen, porque sí existen nanoformulaciones poliméricas aprobadas, que encapsulan otros componentes como sistemas de liberación controlada para el tratamiento de varios tipos de cáncer (Pérez-Herrero & Fernández-Medarde, 2015; Li et al., 2019).

El propósito de los sistemas de liberación controlada es mantener un valor deseado de la concentración del fármaco en circulación o en tejido la mayor cantidad de tiempo posible, es decir, son capaces de ejercer un control en la tasa de liberación y duración del medicamento (S. Dash, Murthy, Nath, & Chowdhury, 2010). Las NPs como sistema de transporte de fármacos incrementan la actividad terapéutica al aportar una liberación controlada y duradera (Pedroso-Santana et al., 2020). La liberación de la molécula encapsulada es dependiente de un estímulo y está gobernada por la

solubilidad del bioactivo en agua, siendo las sustancias más solubles las que se liberan con más rapidez que aquellas menos solubles (Lim, Mendes, & Chronakis, 2019).

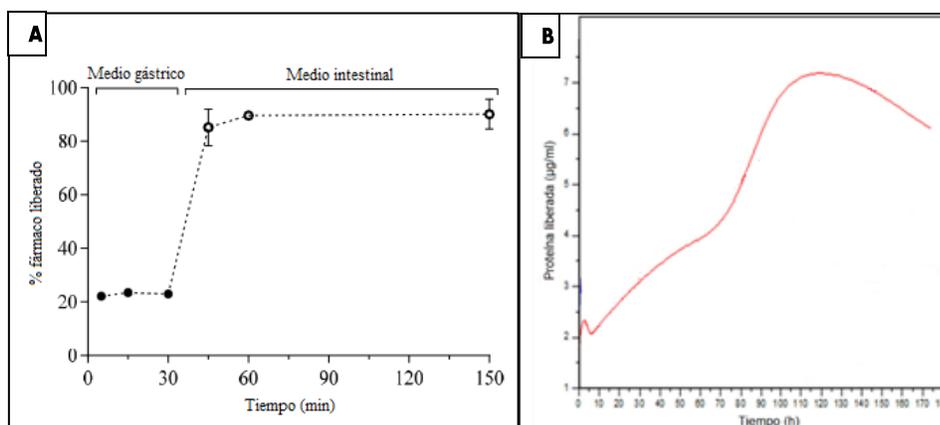
Las NPs pueden ingresar a la célula por endocitosis y pinocitosis (Manzanares & Ceña, 2020). Una vez que las partículas han sido captadas por la célula y se encuentran en los endosomas, la salida de la molécula de estos compartimentos se explica sobre la base de dos mecanismos: el efecto esponja de protones y el efecto hidrogel (S. M. Ahsan et al., 2018). La primera hipótesis corresponde al efecto esponja de protones, exhibido por polímeros catiónicos, como el CS, que implica un bombeo de protones dependiente de ATP al endosoma. La acumulación de protones se equilibra con un influjo de aniones. El aumento de la concentración de iones en el endosoma provoca una hinchazón osmótica y la ruptura de los endosomas, lo que conduce a la liberación de sus componentes en el citosol (Freeman, Weiland, & Meng, 2013). El CS tiene una baja capacidad amortiguadora en el rango de pH 5-7, de manera que es una molécula con escasa capacidad de esponja de protones, lo que provoca un retraso en el escape endosomal, y por subsecuencia, una lenta liberación de su contenido (Raftery, O'Brien, & Cryan, 2013).

El efecto hidrogel es la segunda hipótesis de escape endosomal de las CS-NPs, y propone la rotura de la membrana endosomal a consecuencia del hinchamiento de la matriz polimérica de las NPs a pH bajo frente al influjo de contraiones y el aumento de la osmolalidad, y del hinchamiento propuesto en el efecto esponja de protones (S. M. Ahsan et al., 2018). El fármaco encapsulado se descarga de las NPs, durante el transporte o después de escapar de los endosomas, a través de los mecanismos de difusión, degradación de la matriz polimérica, o ambas (Wong & Choi, 2015).

Los patrones de liberación pueden dividirse en aquellos que liberan el fármaco de forma lenta y sostenida, y aquellos que proveen una rápida dosis inicial seguida de una liberación lenta y sostenida del componente (S. Dash et al., 2010). Para los sistemas que nanoencapsulan IFN $\alpha$  se han reportado ambos patrones *in vitro*. Cánepa y colaboradores (2017) encontraron que un 20.5 % del fármaco fue liberado luego de 30 min, mientras que el 89.6 % de la molécula restante se liberó dentro de los siguientes 30 min (figura 21A) (Cánepa et al., 2017). Por otro lado, Pedroso y colaboradores (2020), quienes desarrollaron una formulación que encapsuló IFN $\alpha$  porcino en CS-NPs, no detectaron cantidades substanciales de IFN $\alpha$  libre a tiempo cero, y observaron bajos niveles de proteína durante las primeras 20 horas (figura 21B), mientras que la liberación progresiva fue apreciada pasadas las 30 horas, alcanzando un máximo entre las 90 y 130 horas (Pedroso-Santana et al., 2020).

## Figura 21

*Patrones observados de liberación de NPs con IFN $\alpha$  encapsulado.*



*Nota.* **A.** Liberación rápida seguida de liberación sostenida. Tomado de Cánepa et al. (2017). **B.** Liberación sostenida. Tomado de Pedroso-Santana et al. (2020)

Pese a las diferencias observadas *in vitro* en los patrones de liberación, los ensayos *in vivo* realizados en estos estudios han permitido comprobar que el IFN $\alpha$  liberado en los sistemas nanoparticulados puede ser detectado en plasma al cabo de un tiempo determinado. Por lo tanto, las investigaciones han concluido que la encapsulación de IFN $\alpha$  en NPs representa una alternativa prometedora con la capacidad de ejercer un control en la tasa de liberación del fármaco.

Los sistemas de transporte de fármacos también se diseñan para proveer la cantidad requerida del agente terapéutico de una manera que maximice su bioactividad y minimice sus efectos secundarios (Varde & Pack, 2004). La actividad biológica es un parámetro que permite demostrar la eficacia de la formulación, ya que dependiendo del sistema de encapsulación, esta actividad puede no ser afectada, o verse disminuida (L. Yang et al., 2006).

El análisis de la actividad biológica de las NPs con IFN $\alpha$  encapsulado se ha estudiado evaluando la inhibición del CPE provocada por la formulación *in vitro*, encontrándose que el IFN $\alpha$  liberado de las partículas no pierde su actividad antiviral, y de hecho es comparable a la del Intron-A (Cánepa et al., 2017). La capacidad que tienen los sistemas nanoparticulados para activar el estado antiviral en células *in vitro* ha sido confirmada al evidenciar que la presencia de proteínas antivirales disminuye en las células tratadas con NPs que encapsulan IFN $\alpha$ , mientras que la expresión de proteínas antivirales aumenta (Cánepa et al., 2017; Pedroso-Santana et al., 2020).

En lo que concierne a ensayos *in vivo*, se ha modelado la farmacocinética en desafíos murinos, donde sea demostrado que el área bajo la curva (AUC) obtenida es de 56 pg\*h/ml, comparable a la biodisponibilidad conseguida cuando se administra Intron-A por vía intravenosa (Imperiale et al., 2019). Los resultados logrados tanto *in*

*vitro* como *in vivo* confirman el potencial terapéutico de las nanoformulaciones en base a su actividad biológica.

Otro aspecto a considerar en el transporte, liberación, y actividad biológica de las NPs es la formación de la corona de proteínas. Al entrar en contacto con un fluido biológico, la superficie de las partículas es modificada por la adsorción de proteínas, que depende de las propiedades fisicoquímicas de la partícula y de la naturaleza del medio biológico (Troeger et al., 2018). La composición de esta corona define la identidad biológica de las NPs, que influye en la cinética de la liberación de la molécula encapsulada, de manera que la predicción definida *in vitro* puede resultar imprecisa (Sharifi, Caracciolo, & Mahmoudi, 2020). La corona formada también afecta la actividad, ya que según la concentración y el tipo de proteínas presentes, el tiempo de circulación puede aumentar o disminuir (Rampado, Crotti, Caliceti, Pucciarelli, & Agostini, 2020). En conclusión, de acuerdo con la identidad biológica de las NPs, la formación de la corona puede favorecer o no el transporte de las partículas.

La revisión bibliográfica reveló que los sistemas que nanoencapsulan al IFN $\alpha$  permiten el transporte seguro y la liberación sostenida de la molécula. Dicha liberación puede presentar una cinética en dos fases (liberación rápida durante las primeras horas seguida de liberación lenta) o en una fase (solo liberación lenta). Además, el proceso de encapsulación no provoca pérdida de su actividad biológica, comparable con la del IFN $\alpha$  libre.

Los resultados de nuestro estudio demostraron que el proceso de producción recombinante de rhIFN $\alpha$ -2b en el sistema de expresión *SHuffle® T7 Express E. coli* permitió obtener una molécula con un alto grado de pureza y una actividad biológica comparable con el IFN $\alpha$  comercial. Este rhIFN $\alpha$ -2b logró ser encapsulado en CS-NPs

esféricas que tuvieron un tamaño dentro del rango 230-475 nm, aunque también se obtuvieron partículas más pequeñas sin molécula encapsulada, y ciertas estructuras irregulares y aglomerados que sugieren que durante el proceso de síntesis se formaron modos inestables del cono de Taylor y del chorro. Por otro lado, la evaluación bibliográfica de los sistemas de liberación de IFN $\alpha$  reveló que las NPs ingresan a la célula por endocitosis y pinocitosis, la molécula escapa a través del efecto esponja de protón y del efecto hidrogel, y su cinética de liberación puede ser en una o dos fases. La actividad y biodisponibilidad de las nanoformulaciones reportadas es similar a la del IFN $\alpha$  comercial. Por estos motivos, la encapsulación de rhIFN $\alpha$ -2b en CS-NPs aporta un sistema activo de liberación sostenida, que podría escalarse a futuro, con los estudios traslacionales adecuados, como una potencial alternativa terapéutica.

## Capítulo 5

### Discusión

El IFN $\alpha$  es una citoquina con actividad antiviral, antiproliferativa e inmunomoduladora, que en la actualidad se emplea en el tratamiento de diversas enfermedades virales y varios tipos de cáncer (Saez et al., 2012). Esta molécula posee una vida media corta, y requiere una administración frecuente a altas dosis para alcanzar su efectividad clínica (Thitinan & McConville, 2009), por lo que se incrementa su toxicidad (Garcia-Garcia et al., 2004). Para aumentar su tiempo de vida media se han investigado diferentes sistemas de administración para fármacos, entre los que se puede destacar la encapsulación (Saez et al., 2012). Mediante este proceso es posible alcanzar un efecto terapéutico elevado con una dosis menor, y minimizar los eventos adversos que puedan presentarse (Kita & Dittrich, 2011)

Los vehículos de transporte más utilizados en la encapsulación del IFN $\alpha$  son los liposomas y las NPs poliméricas, biocompatibles, biodegradables, no tóxicos y no inmunogénicos para el huésped (Wagle et al., 2020). A partir de los resultados proporcionados por la literatura científica se ha demostrado una preferencia en el uso de matrices poliméricas ya que tienen mayor estabilidad y eficiencia de encapsulación que los liposomas (Saez et al., 2012): Estas formulaciones además tienen la ventaja de presentar una mayor absorción por su elevada área superficial respecto al volumen (Musyanovych & Landfester, 2014). Las NPs pueden sintetizarse por diversos métodos: gelificación ionotrópica, evaporación de solvente/co-precipitación, microemulsificación, coacervación compleja, difusión del solvente de emulsificación (Sonaje et al., 2010), y *electrospray* (Abyadeh et al., 2017).

La fabricación de NPs mediante el proceso de *electrospray* permite superar las limitaciones de otras técnicas con el fin de proveer nanoencapsulaciones reproducibles que funcionen como sistemas de transporte de fármacos (Valo et al., 2009). Comparado con otros métodos de encapsulación, el *electrospray* tiene la ventaja de producir partículas con una distribución de tamaño más estrecha y con mayor eficiencia de encapsulación, sin dejar residuos del solvente que se evapora durante el proceso (Enayati et al., 2011; Bohr et al., 2012; Pedroso-Santana & Fleitas-Salazar, 2020). Esta técnica es simple, de un solo paso, no requiere el uso de surfactantes y emplea condiciones suaves en la encapsulación, a temperatura ambiente y presión atmosférica (Y. H. Lee, Mei, Bai, Zhao, & Chen, 2010; Rezvanpour & Wang, 2011).

Hasta la fecha no se han descrito formulaciones que encapsulen el IFN $\alpha$  humano en CS-NPs mediante el método de *electrospray*, razón por la que en el presente trabajo se propuso obtener CS-NPs que encapsulen rhIFN $\alpha$ -2b mediante este método. En la síntesis se tomaron en cuenta los factores necesarios para producir NPs con un tamaño adecuado, para conservar la capacidad biológica de las partículas de atravesar barreras biológicas (Islam, Barua, & Barua, 2017).

Al encapsular el principio activo se obtuvieron partículas esféricas que tenía la particularidad de diferencias en su tamaño, con diámetros promedio dentro del rango 230-475 nm. Se consideraron los tamaños de las NPs obtenidas como son apropiados al compararlos con otros estudios como el de Caster y colaboradores, quienes en 2017 describieron que las partículas menores a 100 nm son menos efectivas y pueden causar mayor toxicidad que aquellas más grandes (Caster et al., 2017). Por su parte, Albarki y Donovan en 2020 concluyeron que las partículas con diámetros superiores a 100 nm son capaces de transportarse hasta diversos tejidos, cerca de vasos sanguíneos y

linfáticos, debido a su mayor capacidad de transferencia de masa comparada con partículas más pequeñas (Albarki & Donovan, 2020), mientras que Cooley y colaboradores encontraron que las NPs con diámetros mayores a 200 nm poseen una incrementada localización y retención en la pared vascular, que facilitaba su migración hacia tejidos adyacentes (Cooley et al., 2018). Banerjee además reportó en el 2016 que la captación celular *in vitro* es mayor en NPs de 200 nm con respecto a aquellas con diámetros superiores a 500 nm (Banerjee, Qi, Gogoi, Wong, & Mitragotri, 2016), es decir que las NPs de mayor diámetro sintetizadas como en nuestro trabajo (475 nm) pueden ser efectivas. Las NPs más pequeñas con diámetros inferiores a 100 nm encontradas en la población podrían ser partículas conformadas solo por CS, sin el rhIFN $\alpha$ -2b encapsulado, en congruencia con los resultados de Zhang y Kawakami, quienes sintetizaron mediante *electrospray* CS-NPs vacías sin principio activo con un tamaño de 124 nm (S. Zhang & Kawakami, 2010). Según estos reportes, el transporte de las partículas obtenidas en este estudio podría ser superior que las descritas en otras formulaciones de IFN $\alpha$  encapsulado más pequeñas, como aquellas de 36 nm preparadas por Cánepa y colaboradores en 2017 (Cánepa et al., 2017)

Abyadeh y colaboradores (2017) refieren que para sintetizar partículas con un tamaño mínimo y distribución estrecha, se debe trabajar con una tasa de flujo mínima y una diferencia de voltaje máxima, junto con una concentración óptima de CS y la proteína (Abyadeh et al., 2017). Estos criterios conllevan a la formación estable del cono de Taylor y del chorro, que es el único modo en el que se produce una población monodispersa de NPs (Smeets et al., 2017). Los valores óptimos de operación del equipo de *electrospray* fueron fijados para la tasa de flujo y para la diferencia de voltaje entre el inyector y el colector. El resultado de esta configuración fue la observación de

un cono de Taylor y un chorro estable (figura 14), semejante a los apreciados en la investigación de Kim y colaboradores, acerca de los factores que influyen en la estabilidad del cono (J. Kim et al., 2020). Sin embargo, la población de NPs obtenidas fue heterodispersa, lo que sugiere que el cono de Taylor y el chorro observados se inestabilizaron en algún momento, sobre todo si se considera que el proceso es muy sensible a pequeñas variaciones (Nguyen, Clasen, & den Mooter, 2016). Songsurang y colaboradores en el 2011, informaron que la síntesis de partículas con tamaños heterogéneos se debieron a la formación de modos variables del cono de Taylor y del chorro, similar a lo encontrado en este trabajo (Songsurang, Praphairaksit, Siraleartmukul, & Muangsin, 2011),

Las partículas heterogéneas de distintos tamaños pudieron formarse cuando aparecieron los modos inestables, que generaron chorros satélites y gotas secundarias, responsables de la constitución de partículas pequeñas y con formas irregulares (Nguyen-Vu, Tran, & Huynh, 2017). Jafari, Barzin, y Mobedi (2015) también informaron la aparición de partículas irregulares producto de la inestabilidad del cono de Taylor y del chorro (Jafari-Nodoushan, Barzin, & Mobedi, 2015).

La inestabilidad manifestada en ciertos momentos del proceso de síntesis puede explicarse en función del cambio en la viscosidad, conductividad y tensión superficial de la solución al añadirse una alta concentración del principio activo, reportada por Taheri y Jafari en su estudio de encapsulación de polisacáridos mediante *electrospray* (Taheri & Jafari, 2019). Por otro lado, Moreira y colaboradores (2020) encontraron que con el paso del tiempo la viscosidad de la solución puede disminuir, y su conductividad aumentar, debido a la evaporación del EtOH, de manera que la preparación se volvió menos apropiada para la síntesis por *electrospray* (Moreira et al., 2020).

La morfología de las NPs fue analizada porque es una condición que puede afectar la solubilidad, biodistribución, vida media, toxicidad, y captación celular de las NPs (Elsabahy & Wooley, 2012). Mediante la observación por microscopía electrónica se determinó que las partículas obtenidas presentaban morfología esférica. Se informaron resultados similares para las CS-NPs con IFN $\alpha$  sintetizadas por gelificación ionotrópica (Cánepa et al., 2017; Pedroso-Santana et al., 2020). Los estudios de Elsabahy y Wooley determinaron que la morfología esférica resulta ventajosa en aspectos relacionados con el desempeño farmacológico de la formulación, pues las NPs con esta forma ingresan a las células más rápido y en mayor medida que aquellas con formas elongadas (Elsabahy & Wooley, 2012).

Los aglomerados observados en el SEM pudieron conformarse por la deposición del polímero provocada por el goteo inestable en ciertos puntos de la síntesis, según reportó Nguyen-Vu (2017) cuando evaluó el efecto que tiene el cono de Taylor en la fabricación de partículas (Nguyen-Vu et al., 2017); sin embargo, este mecanismo no es el único responsable de la formación de aglomerados.

Moraru y colaboradores describieron en 2020 que la agregación de las CS-NPs responde al efecto corona (Moraru, Mincea, Menghiu, & Ostafe, 2020), que consiste en el recubrimiento de la superficie de las NPs por proteínas residentes de un fluido biológico y que tienen la capacidad de interactuar con el medio circundante (Rampado et al., 2020). En su estudio, Moraru concluyó que las cargas positivas en la superficie de las CS-NPs a pH neutro atraen proteínas con carga negativa, lo que puede conducir a un incremento en el efecto de agregación (Moraru et al., 2020). En nuestra síntesis, es posible que las moléculas de rhIFN $\alpha$ -2b no encapsuladas, con carga negativa a pH

neutro (punto isoeléctrico de 5.99) hayan cubierto a varias NPs, permitiéndoles interactuar con la superficie de otras partículas y formar los aglomerados.

Las características del polímero utilizado en la síntesis también influyen en las propiedades de las NPs. En el presente estudio se utilizó LMWC para sintetizar las NPs, de manera similar a como lo hicieron Garg y colaboradores, quienes en 2019 compararon partículas preparadas con HMWC y LMWC a fin de determinar qué polímero era más favorable, y encontraron que los sistemas con LMWC eran menos tóxicos, más degradables, y más solubles que aquellos fabricados con HMWC (Garg et al., 2019). Estas características se traducen en una mayor captación celular de las partículas de LMWC (Bruinsmann et al., 2019).

Además de las características estructurales que definen las propiedades de una nanoformulación, la determinación de su actividad biológica también es un parámetro a considerar cuando se trata de un sistema encapsulado, y dentro de ésta se destaca la cinética de liberación. Según la descripción de Wong y Choi (2015), el patrón de liberación de una molécula encapsulada es un proceso dependiente, controlado, y con una duración definida, que permite incrementar la actividad terapéutica del medicamento (Wong & Choi, 2015). Diferentes ensayos han reportado una cinética de liberación en dos fases: una liberación brusca durante las primeras horas, seguida de una liberación lenta y sostenida (Prego et al., 2010; Katas et al., 2013; S. M. Ahsan et al., 2018). La liberación inicial puede atribuirse a la disociación del medicamento localizado en la superficie de las NPs cuando entra en contacto con fluido biológico (Prego et al., 2010). En contraste, otros estudios no revelaron cantidades significativas del material encapsulado durante las primeras horas, y solo apreciaron la liberación progresiva y sostenida (Ali & Ahmed, 2018; Pedroso-Santana et al., 2020). Esta

situación no ocurre en todos los sistemas nanoencapsulados, por lo que es necesario someter a las partículas a estudios de liberación para determinar qué comportamiento tienen, sobre todo porque una rápida liberación del IFN $\alpha$  puede conllevar a la aparición de toxicidad o futuros eventos adversos (Jansen & Bruijne, 2012).

Como referimos antes, el CS destaca de entre otros polímeros por su biodegradabilidad, biocompatibilidad, y capacidad mucoadhesiva. Además, Du y colaboradores (2015) afirman que la liberación a partir de formulaciones basadas en CS puede responder a condiciones específicas de pH, debido a que a ciertos valores las partículas se vuelven inestables y aumentan su tamaño, lo que implica el ensanchamiento de los canales de la matriz de CS, que facilita la liberación por difusión del principio activo (Du, Liu, Yang, & Zhai, 2015). Utilizando este mecanismo, Pilipenko y colaboradores (2019) lograron desarrollar con éxito sistemas de transporte de fármacos sensibles al pH (Pilipenko et al., 2019).

Harde describió que la liberación dependiente del pH en las nanoformulaciones de CS puede modelarse de forma más precisa, al encontrar que el entrecruzamiento de las cadenas de CS utilizando un agente reticulante mejoraba la resistencia de las NPs preparadas a la degradación química y a condiciones de pH bajos (Harde, Agrawal, & Jain, 2014). En este contexto, Cánepa utilizó para la encapsulación de IFN $\alpha$  en CS-NPs el tripolifosfato de sodio (TPP), un polielectrolito aniónico que por atracción eléctrica interactúa con el CS con carga positiva, formando de esta manera el entrecruzamiento del polímero que favoreció la resistencia a la degradación de las partículas (Cánepa et al., 2017).

Si se enfatiza en el método utilizado para la síntesis de las NPs, los estudios de Tiğli Aydin y Pulat (2012) indican que las CS-NPs preparadas mediante gelificación

ionotrópica son estables en el rango de pH 3.0-7.4, y alcanzan un tamaño máximo cuando el pH es de 5.0, debido a la protonación de los grupos amino, lo que causa un incremento en la densidad eléctrica y la fuerza de repulsión entre las cadenas de CS entrecruzadas (Tiğli Aydın & Pulat, 2012). Esta observación se complementa con la investigación de Imperiale (2019), en la que se menciona que si el pH es muy bajo (igual a 1.0), las NPs conforman una población con diferentes diámetros, inferiores a los observados a pH ácido suave, porque a estos valores el TPP está poco ionizado, lo que no le permite unirse al CS, resultando en la disolución de las partículas. En contraste, cuando el pH es mayor a 7.4, el tamaño aumenta de forma brusca hasta alcanzar diámetros micrométricos debido a la neutralización del CS y la consecuente pérdida de afinidad con el TPP, provocando así la agregación de las NPs (Imperiale et al., 2019). De acuerdo con las descripciones de Pedroso-Santana y Fleitas-Salazar (2020), se esperaría que las partículas sintetizadas mediante el proceso de *electrospray* sean más estables a estos valores extremos de pH, ya que esta técnica no requiere de un agente reticulante, en este caso TPP, de manera que a pH muy bajos las NPs puedan mantenerse como una población monodispersa, mientras que a pH iguales o superiores a 8.0 no formen agregados (Pedroso-Santana & Fleitas-Salazar, 2020).

La resistencia a la degradación de las CS-NPs observada a diferentes valores de pH, sumada a la capacidad mucoadhesiva del polímero y los mecanismos de transporte de las partículas, brinda la posibilidad de administración en varias superficies mucosas, entre las que se pueden mencionar la gastrointestinal (Fallingborg, 1999), ocular (pH 6.6) (Santhi et al., 2017), nasal (pH 6.4) (Liu, Yang, & Ho, 2018), bucal (pH 6.7) (Mazzarino, Borsali, & Lemos-Senna, 2014), pulmonar (pH 7.2) (Petkar et al., 2018) y vaginal (pH 4.5) (Martínez-Pérez et al., 2018).

La capacidad mucoadhesiva de las CS-NPs también influye en la cinética de liberación, pues Kumar (2016) menciona que el incremento en el tiempo de residencia de las partículas debido a la adhesión a la mucosa provoca que el fármaco encapsulado se libere y absorba de forma lenta y gradual, viajando por las células y entrando en circulación de manera efectiva (A. Kumar et al., 2016). Esta liberación sostenida resulta favorable para el caso del IFN $\alpha$ , debido a que los eventos adversos son dependientes de la dosis y por tanto, lograr concentraciones plasmáticas activas con dosis menores permitiría asegurar la eficacia terapéutica, previniendo dichos efectos (Cánepa et al., 2017).

En resumen, las CS-NPs con IFN $\alpha$  encapsulado atraviesan epitelios mediante las vías paracelular y transcelular, y ejercen su acción con una capacidad antiviral similar a la del IFN $\alpha$  sin encapsular, como demostraron los trabajos de evaluación del transporte, cinética de liberación y actividad biológica realizados por Cánepa e Imperiale (Cánepa et al., 2017; Imperiale et al., 2019). De hecho, los estudios en modelos murinos de Imperiale en 2019 revelaron una concentración en plasma comparable con la alcanzada cuando el IFN $\alpha$  libre se administra por vía intravenosa. Además, en el mismo estudio, la molécula fue detectable en plasma a las 0.5 horas, con una concentración similar a la cuantificada luego de una administración subcutánea de IFN $\alpha$  libre (Imperiale et al., 2019). Estos hallazgos confirman el potencial que tiene la encapsulación del IFN $\alpha$  para mejorar su uso clínico, de manera que en estudios futuros pueda investigarse la eficacia de la formulación en modelos animales de enfermedades tratadas con IFN $\alpha$  como medicamento de primera línea (Kristó et al., 2020).

La encapsulación del rhIFN $\alpha$ -2b en CS-NPs realizada en el presente estudio mediante la técnica *electrospray* dio como resultado la obtención de partículas de 230-

475 nm, más grandes a las reportadas en estudios similares que utilizaron otros métodos de síntesis (Cánepa et al., 2017). Esta diferencia de tamaño, sumada las propiedades del CS, se puede traducir en una mayor capacidad de transporte y absorción en el sitio de acción (Caster et al., 2017; Cooley et al., 2018; Albarki & Donovan, 2020). Por otro lado, debe verificarse si la cinética de liberación se produce en una o dos fases en estudios posteriores.

## Capítulo 6

### Conclusiones

- Se obtuvo una nanoformulación basada en CS que permitió encapsular el rhIFN $\alpha$ -2b utilizando la técnica de *electrospray*.
- El LMWC utilizado como polímero de encapsulación alcanzó en las partículas una concentración final del 0.55%.
- El proceso de síntesis de NPs se realizó bajo las siguientes condiciones de operación: flujo de salida de 0.5 ml/h; diferencia de voltaje de 23.84 kV en el inyector, y de 10.18 kV en el colector.
- Las NPs sintetizadas con rhIFN $\alpha$ -2b encapsulado conformaron una población heterodispersa con morfología esférica y cuyos diámetros se encontraron entre los 230 y 475 nm.
- El análisis de las nanoformulaciones que encapsulan al IFN $\alpha$  reportadas en la literatura reveló que los sistemas de liberación pueden obedecer a una cinética de una o dos fases, y que el proceso de encapsulación no modifica la actividad biológica de la molécula.

## Capítulo 7

### Recomendaciones

- Optimizar la concentración de IFN $\alpha$  que se utiliza en el proceso de encapsulación, con el fin de obtener una población más monodispersa de NPs.
- Completar la caracterización física de las partículas, esto es, determinar el PDI, y el potencial zeta.
- Evaluar la eficiencia de encapsulación del proceso, la captación celular de las NPs, la cinética de liberación, y la actividad biológica *in vitro* e *in vivo* del rhIFN $\alpha$ -2b encapsulado, esta última comparada con la del IFN $\alpha$  libre.

## Capítulo 8

### Referencias bibliográficas

- Abyadeh, M., Aghajani, M., Mahmoudabad, A. G., & Amani, A. (2019). Preparation and Optimization of Chitosan/pDNA Nanoparticles Using Electrospray. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences*, 89(3), 931–937. <https://doi.org/10.1007/s40011-018-1009-6>
- Abyadeh, M., Akbar, A., Zarchi, K., Faramarzi, M. A., & Amani, A. (2017). Evaluation of Factors Affecting Size and Size Distribution of Chitosan-Electrosprayed Nanoparticles. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 9(3).
- Adamson, A. W., & Gast, A. P. (1997). *Physical Chemistry of Surfaces* (6th ed.). Wiley.
- Agarwal, S., & Greiner, A. (2011). On the way to clean and safe electrospinning-green electrospinning: Emulsion and suspension electrospinning. *Polymers for Advanced Technologies*, Vol. 22, pp. 372–378. <https://doi.org/10.1002/pat.1883>
- Aghdam, A. G., Vossoughi, M., Almazdeh, I., & Zeinali, M. (2008). Bioconjugation of interferon-alpha molecules to lysine-capped gold nanoparticles for further drug delivery applications. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 29(8), 1062–1065. <https://doi.org/10.1080/01932690701815762>
- Ahsan, F., Gardner, Q. A., Rashid, N., Towers, G. J., & Akhtar, M. (2018). Preventing the N-terminal processing of human interferon  $\alpha$ -2b and its chimeric derivatives expressed in *Escherichia coli*. *Bioorganic Chemistry*, 76, 294–302. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.11.016>
- Ahsan, S. M., Thomas, M., Reddy, K. K., Sooraparaju, S. G., Asthana, A., & Bhatnagar,

- I. (2018). Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 110, pp. 97–109. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.140>
- Albarki, M. A., & Donovan, M. D. (2020). Bigger or Smaller? Size and Loading Effects on Nanoparticle Uptake Efficiency in the Nasal Mucosa. *AAPS PharmSciTech*, 21(8), 1–8. <https://doi.org/10.1208/s12249-020-01837-3>
- Alberti, A. (1999). Interferon alfacon-1: A novel interferon for the treatment of chronic hepatitis C. *BioDrugs*, Vol. 12, pp. 343–357. <https://doi.org/10.2165/00063030-199912050-00003>
- Ali, A., & Ahmed, S. (2018). A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 109, pp. 273–286. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.078>
- Almeida, A. J., & Souto, E. (2007, July 10). Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 59, pp. 478–490. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.04.007>
- Almoustafa, H. A., Alshawsh, M. A., & Chik, Z. (2017, November 25). Technical aspects of preparing PEG-PLGA nanoparticles as carrier for chemotherapeutic agents by nanoprecipitation method. *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 533, pp. 275–284. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.09.054>
- Andersen, J. B., & Hassel, B. A. (2006). The interferon regulated ubiquitin-like protein, ISG15, in tumorigenesis: Friend or foe? *Cytokine and Growth Factor Reviews*, Vol. 17, pp. 411–421. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2006.10.001>

- Andersson, U., & Tracey, K. J. (2011). HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annual Review of Immunology*, 29, 139–162. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101323>
- Andima, M., Costabile, G., Isert, L., Ndakala, A. J., Derese, S., & Merkel, O. M. (2018). Evaluation of  $\beta$ -sitosterol loaded PLGA and PEG-PLA nanoparticles for effective treatment of breast cancer: Preparation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *Pharmaceutics*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040232>
- Arif, A., Gardner, Q. T. A. A., Rashid, N., & Akhtar, M. (2015). Production of human interferon alpha-2b in *Escherichia coli* and removal of N-terminal methionine utilizing archaeal methionine aminopeptidase. *Biologia (Poland)*, 70(7), 982–987. <https://doi.org/10.1515/biolog-2015-0113>
- Arif, A., Mohammed, K., & Nadeem, M. S. (2018). Biochemical and in silico evaluation of recombinant e. Coli aminopeptidase and in vitro processed human interferon  $\alpha$ -2b. *Turkish Journal of Biology*, 42(3), 240–249. <https://doi.org/10.3906/biy-1801-83>
- Asselah, T., Lada, O., Moucari, R., Martinot, M., Boyer, N., & Marcellin, P. (2007). Interferon Therapy for Chronic Hepatitis B. *Clinics in Liver Disease*, Vol. 11, pp. 839–849. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2007.08.010>
- Asselin-Paturel, C., Boonstra, A., Dalod, M., Durand, I., Yessaad, N., Dezutter-Dambuyant, C., ... Trinchieri, G. (2001). Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nature Immunology*, 2(12), 1144–1150. <https://doi.org/10.1038/ni736>
- Au-Yeung, N., & Horvath, C. M. (2018). Transcriptional and chromatin regulation in

interferon and innate antiviral gene expression. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, Vol. 44, pp. 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2018.10.003>

Bandehagh, A., Khodadadi, E., & Noparvar, P. M. (2016). Production of therapeutic proteins through plant tissue and cell culture Cytotoxic Activities Effect of *Salvia Officinalis* L. Extract on cancer Cells View project Investigating the Possibility of Transferring Soil Bacteria to Wheat Seeds for Salt Toleranc. *J. BioSci. Biotech.*, 5(1), 93–104. Retrieved from <http://www.jbb.uni-plovdiv.bg>

Banerjee, A., Qi, J., Gogoi, R., Wong, J., & Mitragotri, S. (2016). Role of nanoparticle size, shape and surface chemistry in oral drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 238, 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.07.051>

Behzadi, S., Serpooshan, V., Tao, W., Hamaly, M. A., Alkawareek, M. Y., Dreaden, E. C., ... Mahmoudi, M. (2017, July 21). Cellular uptake of nanoparticles: Journey inside the cell. *Chemical Society Reviews*, Vol. 46, pp. 4218–4244. <https://doi.org/10.1039/c6cs00636a>

Bekisz, J., Baron, S., Balinsky, C., Morrow, A., & Zoon, K. C. (2010). Antiproliferative properties of type I and type II interferon. *Pharmaceuticals*, Vol. 3, pp. 994–1015. <https://doi.org/10.3390/ph3040994>

Bekisz, J., Schmeisser, H., Hernandez, J., Goldman, N. D., & Zoon, K. C. (2004). Human Interferons Alpha. *Beta and Omega*, 22(4), 243–251. <https://doi.org/10.1080/08977190400000833>

Bellich, B., D'Agostino, I., Semeraro, S., Gamini, A., & Cesàro, A. (2016). “The good, the bad and the ugly” of chitosans. *Marine Drugs*, Vol. 14. <https://doi.org/10.3390/md14050099>

- Bewersdorf, J. P., Giri, S., Wang, R., Podoltsev, N., Williams, R. T., Rampal, R. K., ... Stahl, M. (2020). Interferon Therapy in Myelofibrosis: Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, 20(10), e712–e723.  
<https://doi.org/10.1016/j.clml.2020.05.018>
- Bhardwaj, V., Hariharan, S., Bala, I., Lamprecht, A., Kumar, N., Panchagnula, R., & Kumar, M. N. V. R. (2006). Pharmaceutical Aspects of Polymeric Nanoparticles for Oral Drug Delivery. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 1(3), 235–258.  
<https://doi.org/10.1166/jbn.2005.033>
- Bohr, A., Yang, M., Baldursdóttir, S., Kristensen, J., Dyas, M., Stride, E., & Edirisinghe, M. (2012). Particle formation and characteristics of Celecoxib-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles prepared in different solvents using electrospraying. *Polymer*, 53(15), 3220–3229. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2012.05.002>
- Bon, A. Le, Etchart, N., Rossmann, C., Ashton, M., Hou, S., Gewert, D., ... Tough, D. F. (2003). Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nature Immunology*, 4(10), 1009–1015. <https://doi.org/10.1038/ni978>
- Bondar, O. V., Saifullina, D. V., Shakhmaeva, I. I., Mavlyutova, I. I., & Abdullin, T. I. (2012). Monitoring of the Zeta Potential of Human Cells upon Reduction in Their Viability and Interaction with Polymers. *Acta Naturae*, 4(1), 78–81.  
<https://doi.org/10.32607/20758251-2012-4-1-78-81>
- Borden, E. C., Sen, G. C., Uze, G., Silverman, R. H., Ransohoff, R. M., Foster, G. R., & Stark, G. R. (2007). Interferons at age 50: Past, current and future impact on biomedicine. *Nature Reviews Drug Discovery*, Vol. 6, pp. 975–990.  
<https://doi.org/10.1038/nrd2422>

- Boulestin, A., Kamar, N., Sandres-Sauné, K., Alric, L., Vinel, J. P., Rostaing, L., & Izopet, J. (2006). Pegylation of IFN- $\alpha$  and antiviral activity. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 26(12), 849–853. <https://doi.org/10.1089/jir.2006.26.849>
- Brandtzaeg, P. (2007). Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. *Vaccine*, Vol. 25, pp. 5467–5484. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.12.001>
- Brown, S. C., Palazuelos, M., Sharma, P., Powers, K. W., Roberts, S. M., Grobmyer, S. R., & Moudgil, B. M. (2010). Nanoparticle characterization for cancer nanotechnology and other biological applications. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, Vol. 624, pp. 39–65. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-609-2\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-609-2_4)
- Bruinsmann, F. A., Pigana, S., Aguirre, T., Souto, G. D., Pereira, G. G., Bianchera, A., ... Sonvico, F. (2019). Chitosan-coated nanoparticles: Effect of chitosan molecular weight on nasal transmucosal delivery. *Pharmaceutics*, 11(2), 86. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11020086>
- Cánepa, C., Imperiale, J. C., Berini, C. A., Lewicki, M., Sosnik, A., & Biglione, M. M. (2017). Development of a drug delivery system based on chitosan nanoparticles for oral administration of interferon-alpha. *Biomacromolecules*. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00959>
- Caster, J. M., Yu, S. K., Patel, A. N., Newman, N. J., Lee, Z. J., Warner, S. B., ... Wang, A. Z. (2017). Effect of particle size on the biodistribution, toxicity, and efficacy of drug-loaded polymeric nanoparticles in chemoradiotherapy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 13(5), 1673–1683. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2017.03.002>

- Castro, Z. C., & Castro, Z. E. C. (2014). Uso del interferón alfa en enfermedades virales por vía tópica. *Revista Médica Electrónica*, 29(6), 665–677. Retrieved from <http://www.revmedicaelectronica.sld.cu/index.php/rme/article/view/456>
- Champion, C. I., Kickhoefer, V. A., Liu, G., Moniz, R. J., Freed, A. S., Bergmann, L. L., ... Kelly, K. A. (2009). A Vault Nanoparticle Vaccine Induces Protective Mucosal Immunity. *PLoS ONE*, 4(4), e5409. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005409>
- Chen, D. R., & Pui, D. Y. H. (1997). Experimental investigation of scaling laws for electrospraying: Dielectric constant effect. *Aerosol Science and Technology*, 27(3), 367–380. <https://doi.org/10.1080/02786829708965479>
- Chen, J., Qiu, Y., Zhang, S., & Gao, Y. (2016). Dissolving microneedle-based intradermal delivery of interferon- $\alpha$ -2b. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 42(6), 890–896. <https://doi.org/10.3109/03639045.2015.1096282>
- Chen, S. J., Wang, S. C., & Chen, Y. C. (2019, December 23). Antiviral agents as therapeutic strategies against cytomegalovirus infections. *Viruses*, Vol. 12. <https://doi.org/10.3390/v12010021>
- Cho, E. J., Holback, H., Liu, K. C., Abouelmagd, S. A., Park, J., & Yeo, Y. (2013). Nanoparticle characterization: State of the art, challenges, and emerging technologies. *Molecular Pharmaceutics*, Vol. 10, pp. 2093–2110. <https://doi.org/10.1021/mp300697h>
- Clercq, E. De, & Li, G. (2016). Approved antiviral drugs over the past 50 years. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 29, pp. 695–747. <https://doi.org/10.1128/CMR.00102-15>
- Colonna, M., Trinchieri, G., & Liu, Y. J. (2004). Plasmacytoid dendritic cells in immunity.

*Nature Immunology*, Vol. 5, pp. 1219–1226. <https://doi.org/10.1038/ni1141>

Conlon, K. C., Miljkovic, M. D., & Waldmann, T. A. (2019). Cytokines in the Treatment of Cancer. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 39(1), 6–21.

<https://doi.org/10.1089/jir.2018.0019>

Cooksley, W. G. E., Piratvisuth, T., Lee, S. D., Mahachai, V., Chao, Y. C., Tanwadee, T., ... Pluck, N. (2003). Peginterferon  $\alpha$ -2a (40 kDa): An advance in the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *Journal of Viral Hepatitis*, 10(4), 298–305. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2893.2003.00450.x>

Cooley, M., Sarode, A., Hoore, M., Fedosov, D. A., Mitragotri, S., & Sen Gupta, A.

(2018). Influence of particle size and shape on their margination and wall-adhesion: implications in drug delivery vehicle design across nano-to-micro scale. *Nanoscale*, 10(32), 15350–15364. <https://doi.org/10.1039/c8nr04042g>

Crosse, K. M., Monson, E. A., Beard, M. R., & Helbig, K. J. (2018). Interferon-Stimulated Genes as Enhancers of Antiviral Innate Immune Signaling. *Journal of Innate Immunity*, Vol. 10, pp. 85–93. <https://doi.org/10.1159/000484258>

Cull, V. S., Tilbrook, P. A., Bartlett, E. J., Brekalo, N. L., & James, C. M. (2003). Type I interferon differential therapy for erythroleukemia: Specificity of STAT activation. *Blood*, 101(7), 2727–2735. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-05-1521>

Dadkhah Tehrani, A., & Parsamanesh, M. (2017). Preparation, characterization and drug delivery study of a novel nanobiopolymeric multidrug delivery system. *Materials Science and Engineering C*, 73, 516–524.

<https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.12.103>

- Dai, L., & Si, C. (2018). Recent Advances on Cellulose-Based Nano-Drug Delivery Systems: Design of Prodrugs and Nanoparticles. *Current Medicinal Chemistry*, 26(14), 2410–2429. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170711131353>
- Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., ... Mozafari, M. R. (2018, May 18). Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, Vol. 10. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>
- das Neves, J., Nunes, R., Machado, A., & Sarmiento, B. (2015). Polymer-based nanocarriers for vaginal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 92, pp. 53–70. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.12.004>
- Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M., & Chiellini, E. (2011). Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, Vol. 36, pp. 981–1014. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.02.001>
- Dash, S., Murthy, P. N., Nath, L., & Chowdhury, P. (2010). Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 67(3), 217–223.
- Deng, W., Klemic, J. F., Li, X., Reed, M. A., & Gomez, A. (2006). Increase of electrospray throughput using multiplexed microfabricated sources for the scalable generation of monodisperse droplets. *Journal of Aerosol Science*, 37(6), 696–714. <https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2005.05.011>
- Dingermann, T. (2008). Recombinant therapeutic proteins: Production platforms and challenges. *Biotechnology Journal*, 3(1), 90–97. <https://doi.org/10.1002/biot.200700214>

- Dounighi, M. (2018). Chitosan-based Nanoparticles in Mucosal Vaccine Delivery. *Archives of Razi Institute*, Vol. 73, pp. 165–176.
- Du, H., Liu, M., Yang, X., & Zhai, G. (2015, August 1). The design of pH-sensitive chitosan-based formulations for gastrointestinal delivery. *Drug Discovery Today*, Vol. 20, pp. 1004–1011. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2015.03.002>
- Dufort, S., Sancey, L., & Coll, J. L. (2012). Physico-chemical parameters that govern nanoparticles fate also dictate rules for their molecular evolution. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 64, pp. 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.09.009>
- Durbin, R. K., Kotenko, S. V, & Durbin, J. E. (2013). Interferon induction and function at the mucosal surface. *Immunological Reviews*, 255(1), 25–39. <https://doi.org/10.1111/imr.12101>
- El-Baky, N. A., Linjawi, M. H., & Redwan, E. M. (2015). Auto-induction expression of human consensus interferon-alpha in Escherichia coli. *BMC Biotechnology*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0128-x>
- Elsabahy, M., & Wooley, K. L. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. , 41 *Chemical Society Reviews* § (2012).
- Enayati, M., Chang, M. W., Bragman, F., Edirisinghe, M., & Stride, E. (2011). Electrohydrodynamic preparation of particles, capsules and bubbles for biomedical engineering applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 382(1–3), 154–164. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2010.11.038>
- Eppstein, D. A., & Stewart, W. E. (1981). Binding and Capture of Human Interferon-

Alpha by Reverse Evaporation Vesicles, Multilamellar Vesicles, and Small Unilamellar Vesicles. *Journal of Interferon Research*, 1(4), 495–504.

<https://doi.org/10.1089/jir.1981.1.495>

Fabrizi, F., Cerutti, R., Porata, G., Messa, P., & Ridruejo, E. (2019, December 1). Direct-acting antiviral agents for HCV-associated glomerular disease and the current evidence. *Pathogens*, Vol. 8. <https://doi.org/10.3390/pathogens8040176>

Fallingborg, J. (1999). Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract. *Danish Medical Bulletin*, 46(3), 183–196.

Felberbaum, R. S. (2015). The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors. *Biotechnology Journal*, Vol. 10, pp. 702–714. <https://doi.org/10.1002/biot.201400438>

Ferrer-Miralles, N., Saccardo, P., Corchero, J. L., Xu, Z., & Garcia-Fruitós, E. (2015). General introduction: Recombinant protein production and purification of insoluble proteins. *Methods in Molecular Biology*, 1258, 1–24. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2205-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2205-5_1)

Fornaguera, C., & Solans, C. (2018). Characterization of Polymeric Nanoparticle Dispersions for Biomedical Applications: Size, Surface Charge and Stability. *Pharmaceutical Nanotechnology*, 6(3), 147–164. <https://doi.org/10.2174/2211738506666180706121515>

Foster, G. R. (2010). Pegylated interferons for the treatment of chronic hepatitis C: Pharmacological and clinical differences between peginterferon- $\alpha$ -2a and peginterferon- $\alpha$ -2b. *Drugs*, Vol. 70, pp. 147–165. <https://doi.org/10.2165/11531990-000000000-00000>

- Freeman, E. C., Weiland, L. M., & Meng, W. S. (2013). Modeling the proton sponge hypothesis: Examining proton sponge effectiveness for enhancing intracellular gene delivery through multiscale modeling. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 24(4), 398–416. <https://doi.org/10.1080/09205063.2012.690282>
- Freigassner, M., Pichler, H., & Glieder, A. (2009). Tuning microbial hosts for membrane protein production. *Microbial Cell Factories*, Vol. 8. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-8-69>
- Fujihashi, K., Boyaka, P. N., & McGhee, J. R. (2008). Host defenses at mucosal surfaces. *Clinical Immunology*, 287–303.
- Garcia-Garcia, I., Gonzales-Delgado, C. A., Valenzuela-Silva, C., Hernandez-Bernal, F., Ferrero-Bibilonia, J., Soto-Hernandez, R., ... Lopez-Saura, P. (2004). Bioequivalence of two recombinant interferon  $\alpha$ -2b liquid formulations in healthy male volunteers. *Drugs in R and D*, 5(5), 271–280. <https://doi.org/10.2165/00126839-200405050-00003>
- García-Sastre, A., Durbin, R. K., Zheng, H., Palese, P., Gertner, R., Levy, D. E., & Durbin, J. E. (1998). The Role of Interferon in Influenza Virus Tissue Tropism. *Journal of Virology*, 72(11), 8550–8558. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.11.8550-8558.1998>
- Garg, U., Chauhan, S., Nagaich, U., & Jain, N. (2019). Current advances in chitosan nanoparticles based drug delivery and targeting. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, Vol. 9, pp. 195–204. <https://doi.org/10.15171/apb.2019.023>
- Ghasemi, R., Abdollahi, M., Emamgholi Zadeh, E., Khodabakhshi, K., Badeli, A., Bagheri, H., & Hosseinkhani, S. (2018). MPEG-PLA and PLA-PEG-PLA

nanoparticles as new carriers for delivery of recombinant human Growth Hormone (rhGH). *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28092-8>

Gibbert, K., Joedicke, J. J., Meryk, A., Trilling, M., Francois, S., Duppach, J., ... Dittmer, U. (2012). Interferon-alpha Subtype 11 Activates NK Cells and Enables Control of Retroviral Infection. *PLoS Pathogens*, 8(8), e1002868.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002868>

Gil, M. P., Ploquin, M. J. Y., Watford, W. T., Lee, S. H., Kim, K., Wang, X., ... Biron, C. A. (2012). Regulating type 1 IFN effects in CD8 T cells during viral infections: Changing STAT4 and STAT1 expression for function. *Blood*, 120(18), 3718–3728.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2012-05-428672>

Gillies, E. R., & Fréchet, J. M. J. (2005). Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. *Drug Discovery Today*, Vol. 10, pp. 35–43. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(04\)03276-3](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(04)03276-3)

Grandér, D., Sangfelt, O., & Erickson, S. (1997). How does interferon exert its cell growth inhibitory effect? *European Journal of Haematology*, Vol. 59, pp. 129–135.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1997.tb00965.x>

Groothuis, T., & Neefjes, J. (2006). The ins and outs of intracellular peptides and antigen presentation by MHC class I molecules. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Vol. 300, pp. 127–148. [https://doi.org/10.1007/3-540-28007-3\\_6](https://doi.org/10.1007/3-540-28007-3_6)

Gulick, R. M., & Flexner, C. (2019, January 27). Long-acting HIV drugs for treatment and prevention. *Annual Review of Medicine*, Vol. 70, pp. 137–150.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-med-041217-013717>

- Gunn, M. D., Kyuwa, S., Tam, C., Kakiuchi, T., Matsuzawa, A., Williams, L. T., & Nakano, H. (1999). Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *Journal of Experimental Medicine*, 189(3), 451–460.  
<https://doi.org/10.1084/jem.189.3.451>
- Haller, O., Staeheli, P., & Kochs, G. (2007). Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *Biochimie*, Vol. 89, pp. 812–818.  
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.04.015>
- Hamdi, M., Nasri, R., Li, S., & Nasri, M. (2020). Design of blue crab chitosan responsive nanoparticles as controlled-release nanocarrier: Physicochemical features, thermal stability and in vitro pH-dependent delivery properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 145, 1140–1154.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.039>
- Harde, H., Agrawal, A. K., & Jain, S. (2014). Development of stabilized glucomannosylated chitosan nanoparticles using tandem crosslinking method for oral vaccine delivery. *Nanomedicine*, 9(16), 2511–2529.  
<https://doi.org/10.2217/nnm.13.225>
- Hardy, M. P., Owczarek, C. M., Jermini, L. S., Ejdebäck, M., & Hertzog, P. J. (2004). Characterization of the type I interferon locus and identification of novel genes. *Genomics*, 84(2), 331–345. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2004.03.003>
- Hayden, F. G., & Shindo, N. (2019, April 1). Influenza virus polymerase inhibitors in clinical development. *Current Opinion in Infectious Diseases*, Vol. 32, pp. 176–186.  
<https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000532>

- Honda, K., Takaoka, A., & Taniguchi, T. (2006). Type I Interferon Gene Induction by the Interferon Regulatory Factor Family of Transcription Factors. *Immunity*, Vol. 25, pp. 349–360. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.08.009>
- Hoofnagle, J. H., & Di Bisceglie, A. M. (1997). The Treatment of Chronic Viral Hepatitis. *New England Journal of Medicine*, 336(5), 347–356. <https://doi.org/10.1056/NEJM199701303360507>
- Hopps, H. E., Zoon, K. C., Djeu, J. Y., & Petricciani, J. C. (1985). Interferons For Clinical Use: Purity, Potency And Safety (N. B. Finter & R. K. Oldham, Eds.). *Interferon*, Volume 4, pp. 121–133. Elsevier Science Publishers.
- Hoshino, K., Sugiyama, T., Matsumoto, M., Tanaka, T., Saito, M., Hemmi, H., ... Kaisho, T. (2006). I $\kappa$ B kinase- $\alpha$  is critical for interferon- $\alpha$  production induced by Toll-like receptors 7 and 9. *Nature*, 440(7086), 949–953. <https://doi.org/10.1038/nature04641>
- Imperiale, J. C., Schlachet, I., Lewicki, M., Sosnik, A., & Biglione, M. M. (2019). Oral Pharmacokinetics of a Chitosan-Based Nano- Drug Delivery System of Interferon Alpha. *Polymers*, 11(11), 1862. <https://doi.org/10.3390/polym11111862>
- Islam, M. A., Barua, S., & Barua, D. (2017). A multiscale modeling study of particle size effects on the tissue penetration efficacy of drug-delivery nanoparticles. *BMC Systems Biology*, 11(1), 113. <https://doi.org/10.1186/s12918-017-0491-4>
- Ivashkiv, L. B., & Donlin, L. T. (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nature Reviews Immunology*, Vol. 14, pp. 36–49. <https://doi.org/10.1038/nri3581>
- Iwasaki, A. (2010). Antiviral immune responses in the genital tract: Clues for vaccines.

- Nature Reviews Immunology*, Vol. 10, pp. 699–711. <https://doi.org/10.1038/nri2836>
- Iwasaki, A. (2012). A Virological View of Innate Immune Recognition. *Annual Review of Microbiology*, 66(1), 177–196. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150203>
- Iwasaki, A., & Pillai, P. S. (2014). Innate immunity to influenza virus infection. *Nature Reviews Immunology*, Vol. 14, pp. 315–328. <https://doi.org/10.1038/nri3665>
- J. Isaacs, A. . L. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B - Biological Sciences*, 147(927), 258–267. <https://doi.org/10.1098/rspb.1957.0048>
- Jafari-Nodoushan, M., Barzin, J., & Mobedi, H. (2015). Size and morphology controlling of PLGA microparticles produced by electro hydrodynamic atomization. *Polymers for Advanced Technologies*, 26(5), 502–513. <https://doi.org/10.1002/pat.3480>
- Janes, K. A., Fresneau, M. P., Marazuela, A., Fabra, A., & Alonso, M. J. (2001). Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin. *Journal of Controlled Release*, 73(2–3), 255–267. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00294-2](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00294-2)
- Jansen, P. L. M., & Bruijne, J. De. (2012). Controlled-release interferon alpha 2b, a new member of the interferon family for the treatment of chronic hepatitis C. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 21(1), 111–118. <https://doi.org/10.1517/13543784.2012.640671>
- Jiang, X., Jiang, J., Jin, Y., Wang, E., & Dong, S. (2005). Effect of colloidal gold size on the conformational changes of adsorbed cytochrome c: Probing by circular dichroism, UV-visible, and infrared spectroscopy. *Biomacromolecules*, 6(1), 46–53.

<https://doi.org/10.1021/bm049744l>

Jing, X., Cerveny, M., Yang, K., & He, B. (2004). Replication of Herpes Simplex Virus 1 Depends on the  $\gamma$ 134.5 Functions That Facilitate Virus Response to Interferon and Egress in the Different Stages of Productive Infection. *Journal of Virology*, 78(14), 7653–7666. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.14.7653-7666.2004>

Jøraholmen, M. W., Basnet, P., Acharya, G., & Škalko-Basnet, N. (2017). PEGylated liposomes for topical vaginal therapy improve delivery of interferon alpha. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 113, 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.12.029>

Jordahl, J. H., Ramcharan, S., Gregory, J. V., & Lahann, J. (2017). Needleless Electrohydrodynamic Cojetting of Bicompartmental Particles and Fibers from an Extended Fluid Interface. *Macromolecular Rapid Communications*, 38(1). <https://doi.org/10.1002/marc.201600437>

Kardani, K., Basimi, P., Fekri, M., & Bolhassani, A. (2020, September 1). Antiviral therapy for the sexually transmitted viruses: recent updates on vaccine development. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, Vol. 13, pp. 1001–1046. <https://doi.org/10.1080/17512433.2020.1814743>

Katas, H., Raja, M. A. G., & Lam, K. L. (2013). Development of chitosan nanoparticles as a stable drug delivery system for protein/siRNA. *International Journal of Biomaterials*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/146320>

Katla, S., Yoganand, K. N. R., Hingane, S., Kumar, C. T. R., Anand, B., & Sivaprakasam, S. (2019). Novel glycosylated human interferon alpha 2b expressed in glycoengineered *Pichia pastoris* and its biological activity: N-linked

glycoengineering approach. *Enzyme and Microbial Technology*, 128, 49–58.

<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.05.007>

Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., ... Akira, S.

(2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*, 441(1), 101–105. <https://doi.org/10.1038/nature04734>

Kawai, T., & Akira, S. (2006). TLR signaling. *Cell Death and Differentiation*, Vol. 13, pp.

816–825. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401850>

Kawai, T., Sato, S., Ishii, K. J., Coban, C., Hemmi, H., Yamamoto, M., ... Akira, S.

(2004). Interferon- $\alpha$  induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nature Immunology*, 5(10), 1061–1068.

<https://doi.org/10.1038/ni1118>

Kedar, U., Phutane, P., Shidhaye, S., & Kadam, V. (2010). Advances in polymeric

micelles for drug delivery and tumor targeting. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, Vol. 6, pp. 714–729.

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2010.05.005>

Kennedy, L. C., Bickford, L. R., Lewinski, N. A., Coughlin, A. J., Hu, Y., Day, E. S., ...

Drezek, R. A. (2011). A New Era for Cancer Treatment: Gold-Nanoparticle-Mediated Thermal Therapies. *Small*, 7(2), 169–183.

<https://doi.org/10.1002/smll.201000134>

Khan, M. K. I., Nazir, A., & Maan, A. A. (2017). Electrospraying: a Novel Technique for

Efficient Coating of Foods. *Food Engineering Reviews*, Vol. 9, pp. 112–119.

<https://doi.org/10.1007/s12393-016-9150-6>

- Khdaif, A., Hamad, I., Alkhatib, H., Bustanji, Y., Mohammad, M., Tayem, R., & Aiedeh, K. (2016). Modified-chitosan nanoparticles: Novel drug delivery systems improve oral bioavailability of doxorubicin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 93, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.07.012>
- Kickhoefer, V. A., Han, M., Raval-Fernandes, S., Poderycki, M. J., Moniz, R. J., Vaccari, D., ... Rome, L. H. (2009). Targeting vault nanoparticles to specific cell surface receptors. *ACS Nano*, 3(1), 27–36. <https://doi.org/10.1021/nn800638x>
- Killion, J. J., Fan, D., Bucana, C. D., Frangos, D. N., Price, J. E., & Fidler, I. J. (1989). Augmentation of Antiproliferative Activity of Interferon Alfa Against Human Bladder Tumor Cell Lines by Encapsulation of Interferon Alfa Within Liposomes. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 81(18), 1387–1392. <https://doi.org/10.1093/JNCI/81.18.1387>
- Killion, J. J., Fishbeck, R., Bar-Eli, M., & Chernajovsky, Y. (1994). Delivery of interferon to intracellular pathways by encapsulation of interferon into multilamellar liposomes is independent of the status of interferon receptors. *Cytokine*, 6(4), 443–449. [https://doi.org/10.1016/1043-4666\(94\)90069-8](https://doi.org/10.1016/1043-4666(94)90069-8)
- Kim, J., Tran, S. B. Q., Seong, B., Lee, H., Kang, G., Ko, J. H., & Byun, D. (2020). Experimental study on fluid selection for a stable Taylor cone formation via micro-PIV measurement. *Journal of Visualization*, 23(3), 449–457. <https://doi.org/10.1007/s12650-020-00631-4>
- Kim, M. K., Lee, J. Y., Oh, H., Song, D. W., Kwak, H. W., Yun, H., ... Lee, K. H. (2015). Effect of shear viscosity on the preparation of sphere-like silk fibroin microparticles by electrospraying. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79, 988–

995. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.05.040>

Kindler, E., Thiel, V., & Weber, F. (2016). Interaction of SARS and MERS Coronaviruses with the Antiviral Interferon Response. *Advances in Virus Research*, Vol. 96, pp. 219–243. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.08.006>

Kita, K., & Dittrich, C. (2011, March). Drug delivery vehicles with improved encapsulation efficiency: Taking advantage of specific drug-carrier interactions. *Expert Opinion on Drug Delivery*, Vol. 8, pp. 329–342. <https://doi.org/10.1517/17425247.2011.553216>

Kłysik, K., Pietraszek, A., Karewicz, A., & Nowakowska, M. (2020). Acyclovir in the Treatment of Herpes Viruses – A Review. *Current Medicinal Chemistry*, 27(24), 4118–4137. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180309105519>

Koontz, L. (2014). TCA precipitation. *Methods in Enzymology*, Vol. 541, pp. 3–10. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00001-X>

Kotredes, K. P., Thomas, B., & Gamero, A. M. (2017). The protective role of Type I interferons in the gastrointestinal tract. *Frontiers in Immunology*, Vol. 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00410>

Kozłowski, A., & Harris, J. M. (2001). Improvements in protein PEGylation: Pegylated interferons for treatment of hepatitis C. *Journal of Controlled Release*, 72(1–3), 217–224. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00277-2](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00277-2)

Kristó, K., Szekeres, M., Makai, Z., Márki, Á., Kelemen, A., Bali, L., ... Csóka, I. (2020). Preparation and investigation of core-shell nanoparticles containing human interferon- $\alpha$ . *International Journal of Pharmaceutics*, 573, 118825. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118825>

- Kudo, E., Song, E., Yockey, L. J., Rakib, T., Wong, P. W., Homer, R. J., & Iwasaki, A. (2019). Low ambient humidity impairs barrier function and innate resistance against influenza infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *166*(22), 10905–10910. <https://doi.org/10.1073/pnas.1902840116>
- Kumamoto, Y., & Iwasaki, A. (2012). Unique features of antiviral immune system of the vaginal mucosa. *Current Opinion in Immunology*, Vol. 24, pp. 411–416. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.05.006>
- Kumar, A., Vimal, A., & Kumar, A. (2016). Why Chitosan? From properties to perspective of mucosal drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, *91*, 615–622. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2016.05.054>
- Kumar, R., Choubey, D., Lengyel, P., & Sen, G. C. (1988). Studies on the role of the 2'-5'-oligoadenylate synthetase-RNase L pathway in beta interferon-mediated inhibition of encephalomyocarditis virus replication. *Journal of Virology*, *62*(9), 3175–3181. <https://doi.org/10.1128/jvi.62.9.3175-3181.1988>
- Kumar, S. S. D., Rajendran, N. K., Houreld, N. N., & Abrahamse, H. (2018). Recent advances on silver nanoparticle and biopolymer-based biomaterials for wound healing applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 115, pp. 165–175. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.003>
- Kurt-Jones, E. A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L. M., Jones, L. P., Tripp, R. A., ... Finberg, R. W. (2000). Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nature Immunology*, *1*(5), 398–401. <https://doi.org/10.1038/80833>

- Kuruganti, S., Accavitti-Loper, M. A., & Walter, M. R. (2014). Production and characterization of thirteen human type-I interferon- $\alpha$  subtypes. *Protein Expression and Purification*, 103, 75–83. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2014.08.010>
- Kwon, I. C. (2008). Chitosan-based nanoparticles for cancer therapy; tumor specificity and enhanced therapeutic efficacy in tumor-bearing mice. *Journal of Controlled Release*, 132(3), e69–e70. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.09.064>
- Lampertico, P., Agarwal, K., Berg, T., Buti, M., Janssen, H. L. A., Papatheodoridis, G., ... Tacke, F. (2017). EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology*, 67(2), 370–398. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.03.021>
- Lavoie, T. B., Kalie, E., Crisafulli-Cabatu, S., Abramovich, R., DiGioia, G., Moolchan, K., ... Schreiber, G. (2011). Binding and activity of all human alpha interferon subtypes. *Cytokine*, 56(2), 282–289. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2011.07.019>
- Lawitz, E., Rodriguez-Torres, M., Rustgi, V. K., Hassanein, T., Rahimy, M. H., Crowley, C. A., ... Mchutchison, J. (2010). Q2Week controlled-release-interferon-alpha2b + ribavirin reduces flu-like symptoms >50% and provides equivalent efficacy in comparison to weekly pegylated-interferon-alpha2b + ribavirin in treatment-naive-genotype-1-chronic-hepatitis-c: Results from empowe. In *Journal of Hepatology* (Vol. 52). [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(10\)61201-9](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(10)61201-9)
- Lazear, H. M., Schoggins, J. W., & Diamond, M. S. (2019, April 16). Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. *Immunity*, Vol. 50, pp. 907–923. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.025>
- Lebbe, C., Garbe, C., Stratigos, A. J., Harwood, C., Peris, K., del Marmol, V., ... Pages,

- C. (2019). Diagnosis and treatment of Kaposi's sarcoma: European consensus-based interdisciplinary guideline (EDF/EADO/EORTC). *European Journal of Cancer*, 114, 117–127. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.12.036>
- Lee, J. S., & Feijen, J. (2012). Polymersomes for drug delivery: Design, formation and characterization. *Journal of Controlled Release*, Vol. 161, pp. 473–483. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.10.005>
- Lee, M. Y., Yang, J. A., Jung, H. S., Beack, S., Choi, J. E., Hur, W., ... Hahn, S. K. (2012). Hyaluronic acid-gold nanoparticle/interferon  $\alpha$  complex for targeted treatment of hepatitis C virus infection. *ACS Nano*, 6(11), 9522–9531. <https://doi.org/10.1021/nn302538y>
- Lee, Y. H., Mei, F., Bai, M. Y., Zhao, S., & Chen, D. R. (2010). Release profile characteristics of biodegradable-polymer-coated drug particles fabricated by dual-capillary electrospray. *Journal of Controlled Release*, 145(1), 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.03.014>
- Leede, L. G. J. De, Humphries, J. E., Bechet, A. C., Hoogdalem, E. J. Van, Verrijck, R., & Spencer, D. G. (2008). Novel controlled-release Lemna-derived IFN- $\alpha$ 2b (Locteron): Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and tolerability in a phase I clinical trial. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 28(2), 113–122. <https://doi.org/10.1089/jir.2007.0073>
- Lembo, D., & Cavalli, R. (2010). Nanoparticulate delivery systems for antiviral drugs. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, Vol. 21, pp. 53–70. <https://doi.org/10.3851/IMP1684>
- Lembo, D., Donalisio, M., Civra, A., Argenziano, M., & Cavalli, R. (2018). Nanomedicine

formulations for the delivery of antiviral drugs: a promising solution for the treatment of viral infections. *Expert Opinion on Drug Delivery*, Vol. 15, pp. 93–114.

<https://doi.org/10.1080/17425247.2017.1360863>

Lengyel, P. (1993). Tumor-suppressor genes: News about the interferon connection.

*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,

Vol. 90, pp. 5893–5895. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.13.5893>

Lenschow, D. J., Lai, C., Frias-Staheli, N., Giannakopoulos, N. V, Lutz, A., Wolff, T., ...

IV, H. W. V. (2007). IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(4), 1371–1376.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0607038104>

Lewczuk, N., Zdebik, A., & Bogusławska, J. (2019). Interferon Alpha 2a and 2b in

Ophthalmology: A Review. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, Vol. 39, pp. 259–272. <https://doi.org/10.1089/jir.2018.0125>

Li, C., Wang, J., Wang, Y., Gao, H., Wei, G., Huang, Y., ... Jin, Y. (2019). Recent

progress in drug delivery. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, Vol. 9, pp. 1145–1162.

<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.08.003>

Lim, L. T., Mendes, A. C., & Chronakis, I. S. (2019). Electrospinning and electrospraying

technologies for food applications. In *Advances in Food and Nutrition Research*

(Vol. 88, pp. 167–234). <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2019.02.005>

Liu, S., Yang, S., & Ho, P. C. (2018). Intranasal administration of carbamazepine-loaded

carboxymethyl chitosan nanoparticles for drug delivery to the brain. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(1), 72–81.

<https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.09.001>

Lobstein, J., Emrich, C. A., Jeans, C., Faulkner, M., Riggs, P., & Berkmen, M. (2012).

SHuffle, a novel Escherichia coli protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. *Microbial Cell Factories*, 11.

<https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-56>

Loscertales, I. G., Barrero, A., Guerrero, I., Cortijo, R., Marquez, M., & Gañán-Calvo, A.

M. (2002). Micro/nano encapsulation via electrified coaxial liquid jets. *Science*, 295(5560), 1695–1698. <https://doi.org/10.1126/science.1067595>

Lu, J., Hou, R., Yang, Z., & Tang, Z. (2015). Development and characterization of drug-loaded biodegradable PLA microcarriers prepared by the electrospraying technique.

*International Journal of Molecular Medicine*, 36(1), 249–254.

<https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2201>

Lu, X. Y., Wu, D. C., Li, Z. J., & Chen, G. Q. (2011). Polymer nanoparticles. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Vol. 104, pp. 299–323.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416020-0.00007-3>

Luft, T., Pang, K. C., Thomas, E., Hertzog, P., Hart, D. N. J., Trapani, J., & Cebon, J.

(1998). Type I IFNs Enhance the Terminal Differentiation of Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 161(4).

Luque-Alcaraz, A. G., Lizardi-Mendoza, J., Goycoolea, F. M., Higuera-Ciapara, I., &

Argüelles-Monal, W. (2016). Preparation of chitosan nanoparticles by nanoprecipitation and their ability as a drug nanocarrier. *RSC Advances*, 6(64),

59250–59256. <https://doi.org/10.1039/c6ra06563e>

- Mahl, D., Diendorf, J., Meyer-Zaika, W., & Epple, M. (2011). Possibilities and limitations of different analytical methods for the size determination of a bimodal dispersion of metallic nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 377(1–3), 386–392. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.01.031>
- Mahmoud, A. (2016). New vaccines: challenges of discovery. *Microbial Biotechnology*, 9(5), 549–552. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12397>
- Manzanares, D., & Ceña, V. (2020). Endocytosis: The nanoparticle and submicron nanocompounds gateway into the cell. *Pharmaceutics*, 12(4), 1–22. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12040371>
- Martínez-Pérez, B., Quintanar-Guerrero, D., Tapia-Tapia, M., Cisneros-Tamayo, R., Zambrano-Zaragoza, M. L., Alcalá-Alcalá, S., ... Piñón-Segundo, E. (2018). Controlled-release biodegradable nanoparticles: From preparation to vaginal applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 115, 185–195. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.11.029>
- Matsuoka, M., Tani, K., & Asano, S. (1998). Interferon- $\alpha$ -induced G1 phase arrest through up-regulated expression of CDK inhibitors, p19(Ink4D) and p21(Cip1) in mouse macrophages. *Oncogene*, 16(16), 2075–2086. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201745>
- Mattei, F., Schiavoni, G., Belardelli, F., & Tough, D. F. (2001). IL-15 Is Expressed by Dendritic Cells in Response to Type I IFN, Double-Stranded RNA, or Lipopolysaccharide and Promotes Dendritic Cell Activation. *The Journal of Immunology*, 167(3), 1179–1187. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.3.1179>
- Maughan, A., & Ogbuagu, O. (2018). Pegylated interferon alpha 2a for the treatment of

- hepatitis C virus infection. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 14(2), 219–227. <https://doi.org/10.1080/17425255.2018.1421173>
- Mazzarino, L., Borsali, R., & Lemos-Senna, E. (2014). Mucoadhesive films containing chitosan-coated nanoparticles: A new strategy for buccal curcumin release. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(11), 3764–3771. <https://doi.org/10.1002/jps.24142>
- McGhee, J. R., & Fujihashi, K. (2012). Inside the Mucosal Immune System. *PLoS Biology*, 10(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001397>
- McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A., & O'Garra, A. (2015). Type I interferons in infectious disease. *Nature Reviews Immunology*, Vol. 15, pp. 87–103. <https://doi.org/10.1038/nri3787>
- Meager, A. (2002). Biological assays for interferons. *Journal of Immunological Methods*, 261(1–2), 21–36. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(01\)00570-1](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(01)00570-1)
- Melian, E. B., & Plosker, G. L. (2001, September 17). Interferon alfacon-1: A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of chronic hepatitis C. *Drugs*, Vol. 61, pp. 1661–1691. <https://doi.org/10.2165/00003495-200161110-00009>
- Meller, S., Gerber, P. A., Kislak, A., Hevezi, P., Göbel, T., Wiesner, U., ... Homey, B. (2015). Allergic sensitization to pegylated interferon- $\alpha$  results in drug eruptions. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 70(7), 775–783. <https://doi.org/10.1111/all.12618>
- Mitra, S., Gaur, U., Ghosh, P. C., & Maitra, A. N. (2001). Tumour targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as

carrier. *Journal of Controlled Release*, 74(1–3), 317–323.

[https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00342-X](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00342-X)

Mogk, A., Mayer, M. P., & Deuerling, E. (2002). Mechanisms of Protein Folding: Molecular Chaperones and Their Application in Biotechnology. *ChemBioChem*, 3(9), 807–814. [https://doi.org/10.1002/1439-7633\(20020902\)3:9<807::aid-cbic807>3.0.co;2-a](https://doi.org/10.1002/1439-7633(20020902)3:9<807::aid-cbic807>3.0.co;2-a)

Mohebbi, S., Nezhad, M. N., Zarrintaj, P., Jafari, S. H., Gholizadeh, S. S., Saeb, M. R., & Mozafari, M. (2018). Chitosan in Biomedical Engineering: A Critical Review. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 14(2), 93–116.

<https://doi.org/10.2174/1574888x13666180912142028>

Moraru, C., Mincea, M., Menghiu, G., & Ostafe, V. (2020). Understanding the factors influencing chitosan-based nanoparticles-protein corona interaction and drug delivery applications. *Molecules*, 25(20), 1–37.

<https://doi.org/10.3390/molecules25204758>

Moreira, A., Lawson, D., Onyekuru, L., Dziemidowicz, K., Angkawinitwong, U., Costa, P. F., ... Williams, G. R. (2020, October 28). Protein encapsulation by electrospinning and electrospraying. *Journal of Controlled Release*.

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.10.046>

Muñoz-Carrillo, J., Contreras-Cordero, J., Gutiérrez-Coronado, O., Villalobos-Gutiérrez, P., Ramos-Gracia, L., & Hernández-Reyes, V. (2019). Cytokine Profiling Plays a Crucial Role in Activating Immune System to Clear Infectious Pathogens. *Immune Response Activation and Immunomodulation*.

<https://doi.org/10.5772/intechopen.80843>

- Murdock, R. C., Braydich-Stolle, L., Schrand, A. M., Schlager, J. J., & Hussain, S. M. (2008). Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicological Sciences*, *101*(2), 239–253. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm240>
- Musumeci, T., Leonardi, A., Bonaccorso, A., Pignatello, R., & Puglisi, G. (2018). Tangential Flow Filtration Technique: an Overview on Nanomedicine Applications. *Pharmaceutical Nanotechnology*, *06*(1). <https://doi.org/10.2174/2211738506666180306160921>
- Musyanovych, A., & Landfester, K. (2014). Polymer micro- and nanocapsules as biological carriers with multifunctional properties. *Macromolecular Bioscience*, Vol. 14, pp. 458–477. <https://doi.org/10.1002/mabi.201300551>
- Muxika, A., Etxabide, A., Uranga, J., Guerrero, P., & de la Caba, K. (2017). Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 105, pp. 1358–1368. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.087>
- Naqvi, S. M., Vedicherla, S., Gansau, J., McIntyre, T., Doherty, M., & Buckley, C. T. (2016). Living Cell Factories - Electrospayed Microcapsules and Microcarriers for Minimally Invasive Delivery. *Advanced Materials*, *28*(27), 5662–5671. <https://doi.org/10.1002/adma.201503598>
- Nasiri, M., Babaie, J., Amiri, S., Azimi, E., Shamshiri, S., Khalaj, V., ... Fard-Esfahani, P. (2017). SHuffle™ T7 strain is capable of producing high amount of recombinant human fibroblast growth factor-1 (rhFGF-1) with proper physicochemical and biological properties. *Journal of Biotechnology*, *259*, 30–38.

<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.08.015>

Naskar, S., Koutsu, K., & Sharma, S. (2019, April 21). Chitosan-based nanoparticles as drug delivery systems: a review on two decades of research. *Journal of Drug Targeting*, Vol. 27, pp. 379–393. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2018.1512112>

Negishi, H., Taniguchi, T., & Yanai, H. (2018). The interferon (IFN) class of cytokines and the IFN regulatory factor (IRF) transcription factor family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(11). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028423>

Negishi, H., Yanai, H., Nakajima, A., Koshihara, R., Atarashi, K., Matsuda, A., ... Taniguchi, T. (2012). Cross-interference of RLR and TLR signaling pathways modulates antibacterial T cell responses. *Nature Immunology*, 13(7), 659–666. <https://doi.org/10.1038/ni.2307>

Nelson, D. R., Rustgi, V., Balan, V., Sulkowski, M. S., Davis, G. L., Muir, A. J., ... Subramanian, G. M. (2009). Safety and Antiviral Activity of Albinterferon Alfa-2b in Prior Interferon Nonresponders With Chronic Hepatitis C. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 7(2), 212–218. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2008.10.035>

Nguyen-Vu, V. L., Tran, N. H., & Huynh, D. P. (2017). Taylor cone-jet mode in the fabrication of electrosprayed microspheres. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 55(1B), 216–222. <https://doi.org/10.15625/2525-2518/55/1b/12112>

Nguyen, D. N., Clasen, C., & den Mooter, G. Van. (2016). Pharmaceutical Applications of Electrospraying. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 105, pp. 2601–2620. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.04.024>

Nicholson, J. K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., & Pettersson,

- S. (2012). Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science*, Vol. 336, pp. 1262–1267. <https://doi.org/10.1126/science.1223813>
- Nile, S. H., Nile, A., Qiu, J., Li, L., Jia, X., & Kai, G. (2020, June 1). COVID-19: Pathogenesis, cytokine storm and therapeutic potential of interferons. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, Vol. 53, pp. 66–70. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2020.05.002>
- O'Hara, A. M., & Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports*, Vol. 7, pp. 688–693. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400731>
- Obeidat, W. M., Schwabe, K., Müller, R. H., & Keck, C. M. (2010). Preservation of nanostructured lipid carriers (NLC). *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 76(1), 56–67. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.05.001>
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., & Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*, Vol. 113, pp. 823–839. <https://doi.org/10.1289/ehp.7339>
- Oganesyan, G., Saha, S. K., Guo, B., He, J. Q., Shahangian, A., Zarnegar, B., ... Cheng, G. (2006). Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature*, 439(7073), 208–211. <https://doi.org/10.1038/nature04374>
- Okumura, A., Lu, G., Pitha-Rowe, I., & Pitha, P. M. (2006). Innate antiviral response targets HIV-1 release by the induction of ubiquitin-like protein ISG15. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(5), 1440–1445. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510518103>

- Olson, B. J. S. C. (2016). Assays for determination of protein concentration. *Current Protocols in Pharmacology*, 2016, A.3A.1-A.3A.32. <https://doi.org/10.1002/cpph.3>
- Owczarek, B., Gerszberg, A., & Hnatuszko-Konka, K. (2019). A Brief Reminder of Systems of Production and Chromatography-Based Recovery of Recombinant Protein Biopharmaceuticals. *BioMed Research International*, Vol. 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4216060>
- Paludan, S. R., & Bowie, A. G. (2013, May 23). Immune Sensing of DNA. *Immunity*, Vol. 38, pp. 870–880. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.05.004>
- Panne, D., McWhirter, S. M., Maniatis, T., & Harrison, S. C. (2007). Interferon regulatory factor 3 is regulated by a dual phosphorylation- dependent switch. *Journal of Biological Chemistry*, 282(31), 22816–22822. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703019200>
- Pant, A., & Negi, J. S. (2018). Novel controlled ionic gelation strategy for chitosan nanoparticles preparation using TPP- $\beta$ -CD inclusion complex. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 112, 180–185. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.11.020>
- Paquette, R. L., Hsu, N. C., Kiertscher, S. M., Park, A. N., Tran, L., Roth, M. D., & Glaspy, J. A. (1998). Interferon- $\alpha$  and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor differentiate peripheral blood monocytes into potent antigen-presenting cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 64(3), 358–367. <https://doi.org/10.1002/jlb.64.3.358>
- Park, A., & Iwasaki, A. (2020). Type I and Type III Interferons – Induction, Signaling, Evasion, and Application to Combat COVID-19. *Cell Host and Microbe*, Vol. 27, pp. 870–878. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.05.008>

- Park, K. (2014). Controlled drug delivery systems: Past forward and future back. *Journal of Controlled Release*, Vol. 190, pp. 3–8.  
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.03.054>
- Patrulea, V., Ostafe, V., Borchard, G., & Jordan, O. (2015). Chitosan as a starting material for wound healing applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Vol. 97, pp. 417–426. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.08.004>
- Pedroso-Santana, S., & Fleitas-Salazar, N. (2020, May 1). Ionotropic gelation method in the synthesis of nanoparticles/microparticles for biomedical purposes. *Polymer International*, Vol. 69, pp. 443–447. <https://doi.org/10.1002/pi.5970>
- Pedroso-Santana, S., Lamazares Arcia, E., Fleitas-Salazar, N., Gancino Guevara, M., Mansilla, R., Gómez-Gaete, C., ... Toledo Alonso, J. R. (2020). Polymeric nanoencapsulation of alpha interferon increases drug bioavailability and induces a sustained antiviral response in vivo. *Materials Science and Engineering C*, 116, 111260. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111260>
- Pérez-Herrero, E., & Fernández-Medarde, A. (2015, June). Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Vol. 93, pp. 52–79.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2015.03.018>
- Perrault, S. D., Walkey, C., Jennings, T., Fischer, H. C., & Chan, W. C. W. (2009). Mediating tumor targeting efficiency of nanoparticles through design. *Nano Letters*, 9(5), 1909–1915. <https://doi.org/10.1021/nl900031y>
- Pestka, S., & Baron, S. (1981). Definition and Classification of the Interferons. *Methods in Enzymology*, 78(C), 3–14. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(81\)78091-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(81)78091-1)

- Pestka, S., Krause, C. D., & Walter, M. R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological Reviews*, 202(1), 8–32.  
<https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00204.x>
- Petkar, K. C., Chavhan, S., Kunda, N., Saleem, I., Somavarapu, S., Taylor, K. M. G., & Sawant, K. K. (2018). Development of Novel Octanoyl Chitosan Nanoparticles for Improved Rifampicin Pulmonary Delivery: Optimization by Factorial Design. *AAPS PharmSciTech*, 19(4), 1758–1772. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-0972-9>
- Pham, P. V. (2018). Medical biotechnology: Techniques and applications. *Omics Technologies and Bio-Engineering: Towards Improving Quality of Life*, Vol. 1, pp. 449–469. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804659-3.00019-1>
- Pilipenko, I., Korzhikov-Vlakh, V., Sharoyko, V., Zhang, N., Schäfer-Korting, M., Rühl, E., ... Tennikova, T. (2019). pH-sensitive chitosan–heparin nanoparticles for effective delivery of genetic drugs into epithelial cells. *Pharmaceutics*, 11(7).  
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11070317>
- Prego, C., Paolicelli, P., Díaz, B., Vicente, S., Sánchez, A., González-Fernández, Á., & Alonso, M. J. (2010). Chitosan-based nanoparticles for improving immunization against hepatitis B infection. *Vaccine*, 28(14), 2607–2614.  
<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.01.011>
- Qin, X. Q., Runkel, L., Deck, C., DeDios, C., & Barsoum, J. (1997). Interferon- $\beta$  induces S phase accumulation selectively in human transformed cells. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 17(6), 355–367. <https://doi.org/10.1089/jir.1997.17.355>
- Rader, R. (2020). *2019 FDA Biopharmaceutical Approvals: A Record Year for Follow-on Products, But is Innovation Lagging?* (pp. 921–5979). pp. 921–5979.

- Rafferty, R., O'Brien, F., & Cryan, S.-A. (2013). Chitosan for Gene Delivery and Orthopedic Tissue Engineering Applications. *Molecules*, *18*(5), 5611–5647. <https://doi.org/10.3390/molecules18055611>
- Rampado, R., Crotti, S., Caliceti, P., Pucciarelli, S., & Agostini, M. (2020, April 3). Recent Advances in Understanding the Protein Corona of Nanoparticles and in the Formulation of “Stealthy” Nanomaterials. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, Vol. 8, p. 166. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00166>
- Ramya, R., Venkatesan, J., Kim, S. K., & Sudha, P. N. (2012). Biomedical applications of chitosan: An overview. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, Vol. 2, pp. 100–111. <https://doi.org/10.1166/jbt.2012.1030>
- Rauch, I., Müller, M., & Decker, T. (2013). The regulation of inflammation by interferons and their STATs. *JAK-STAT*, *2*(1), e23820. <https://doi.org/10.4161/jkst.23820>
- Razavi-Shearer, D., Gamkrelidze, I., Nguyen, M. H., Chen, D. S., Van Damme, P., Abbas, Z., ... Razavi, H. (2018). Global prevalence, treatment, and prevention of hepatitis B virus infection in 2016: a modelling study. *The Lancet Gastroenterology and Hepatology*, *3*(6), 383–403. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(18\)30056-6](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(18)30056-6)
- Rezvanpour, A., & Wang, C. H. (2011). Computational and experimental studies of electrospray deposition process in pharmaceutical micro-pattern formation. *Chemical Engineering Science*, *66*(17), 3836–3849. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2011.05.009>
- Ri, S., Id, J., Ashhurst, T. M., West, P. K., Id, B. V., Kingid, N. J. C., ... Hoferid, M. J. (2020). Contribution of STAT1 to innate and adaptive immunity during type I interferon-mediated lethal virus infection.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008525>

Rizeq, B. R., Younes, N. N., Rasool, K., & Nasrallah, G. K. (2019). Synthesis, bioapplications, and toxicity evaluation of chitosan-based nanoparticles.

*International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 20.

<https://doi.org/10.3390/ijms20225776>

Roos, G., Leanderson, T., & Lundgren, E. (1984). Interferon-induced Cell Cycle Changes in Human Hematopoietic Cell Lines and Fresh Leukemic Cells. *Cancer Research*, 44(6).

Rudd, B. D., Smit, J. J., Flavell, R. A., Alexopoulou, L., Schaller, M. A., Gruber, A., ... Lukacs, N. W. (2006). Deletion of TLR3 Alters the Pulmonary Immune Environment and Mucus Production during Respiratory Syncytial Virus Infection. *The Journal of Immunology*, 176(3), 1937–1942. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.3.1937>

Rumlová, M., & Ruml, T. (2018, May 1). In vitro methods for testing antiviral drugs. *Biotechnology Advances*, Vol. 36, pp. 557–576.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.016>

Saez, V., Ramón, J., Aldana, R., Pérez, D., & Hardy, E. (2008). *Microencapsulation of recombinant interferon  $\alpha$ -2b into poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres.*

Saez, V., Ramón, J., Peniche, C., & Hardy, E. (2012, July 1). Microencapsulation of alpha interferons in biodegradable microspheres. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, Vol. 32, pp. 299–311. <https://doi.org/10.1089/jir.2011.0034>

Safarpour, H., Banadkoki, S. B., Keshavarzi, Z., Morowvat, M. H., Soleimanpour, M., Pourmolaei, S., & Shirazi, F. H. (2017). Expression analysis and ATR-FTIR

characterization of the secondary structure of recombinant human TNF- $\alpha$  from *Escherichia coli* SHuffle® T7 Express and BL21 (DE3) cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, 99, 173–178.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.052>

Saghir, S. A. M., Al-Gabri, N. A., Khafaga, A. F., El-Shaer, N. H., Alhumaidh, K. A., Elsadek, M. F., ... Abd El-Hack, M. E. (2019). Thymoquinone-PLGA-PVA nanoparticles ameliorate bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats via regulation of inflammatory cytokines and iNOS signaling. *Animals*, 9(11).

<https://doi.org/10.3390/ani9110951>

Samuel, C. E. (2001). Antiviral actions of interferons. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 14, pp. 778–809. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.778-809.2001>

Sánchez, A., Tobío, M., González, L., Fabra, A., & Alonso, M. J. (2003). Biodegradable micro- and nanoparticles as long-term delivery vehicles for interferon-alpha. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18(3–4), 221–229.

[https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(03\)00019-8](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(03)00019-8)

Santhi, K., Muralidharan, S., H. Yee, Y., Y. Min, F., Z. Ting, C., & Devi, D. (2017). In-vitro Characterization of Chitosan Nanoparticles of Fluconazole as a Carrier for Sustained Ocular Delivery. *Nanoscience & Nanotechnology-Asia*, 7(1), 41–50.

Santini, S. M., Lapenta, C., Logozzi, M., Parlato, S., Spada, M., Pucchio, T. Di, & Belardelli, F. (2000). Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. *Journal of Experimental Medicine*, 191(10), 1777–1788.

<https://doi.org/10.1084/jem.191.10.1777>

- Sanyakamdhorn, S., Agudelo, D., & Tajmir-Riahi, H. A. (2013). Encapsulation of antitumor drug doxorubicin and its analogue by chitosan nanoparticles. *Biomacromolecules*, 14(2), 557–563. <https://doi.org/10.1021/bm3018577>
- Sarkar, S. N., & Sen, G. C. (2004). Novel functions of proteins encoded by viral stress-inducible genes. *Pharmacology and Therapeutics*, Vol. 103, pp. 245–259. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2004.07.007>
- Schoenborn, J. R., & Wilson, C. B. (2007). Regulation of Interferon- $\gamma$  During Innate and Adaptive Immune Responses. *Advances in Immunology*, Vol. 96, pp. 41–101. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(07\)96002-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(07)96002-2)
- Schoggins, J. W. (2019). Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? *Annual Review of Virology*, 6, 567–584. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015756>
- Schoggins, J. W., & Rice, C. M. (2011). Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Current Opinion in Virology*, Vol. 1, pp. 519–525. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.10.008>
- Senapati, S., Mahanta, A. K., Kumar, S., & Maiti, P. (2018). Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, Vol. 3. <https://doi.org/10.1038/s41392-017-0004-3>
- Severino, P., da Silva, C. F., Andrade, L. N., de Lima Oliveira, D., Campos, J., & Souto, E. B. (2019). Alginate Nanoparticles for Drug Delivery and Targeting. *Current Pharmaceutical Design*, 25(11), 1312–1334. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190425163424>

- Shah, P., Bhalodia, D., & Shelat, P. (2010). Nanoemulsion: A pharmaceutical review. *Systematic Reviews in Pharmacy*, Vol. 1, pp. 24–32. <https://doi.org/10.4103/0975-8453.59509>
- Sharifi, S., Caracciolo, G., & Mahmoudi, M. (2020, September 1). Biomolecular Corona Affects Controlled Release of Drug Payloads from Nanocarriers. *Trends in Pharmacological Sciences*, Vol. 41, pp. 641–652. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.06.011>
- Sharma, D., Sharma, N., Pathak, M., Agrawala, P. K., Basu, M., & Ojha, H. (2018). Nanotechnology-based drug delivery systems: Challenges and opportunities. *Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems*, pp. 39–79. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813689-8.00002-1>
- Sheng, J., Han, L., Qin, J., Ru, G., Li, R., Wu, L., ... Wang, J. (2015). N -Trimethyl Chitosan Chloride-Coated PLGA Nanoparticles Overcoming Multiple Barriers to Oral Insulin Absorption. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7(28), 15430–15441. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b03555>
- Shiraki, K. (2018). Antiviral drugs against alphaherpesvirus. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1045, pp. 103–122). [https://doi.org/10.1007/978-981-10-7230-7\\_6](https://doi.org/10.1007/978-981-10-7230-7_6)
- Smeets, A., Clasen, C., & den Mooter, G. Van. (2017). Electrospraying of polymer solutions: Study of formulation and process parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 119, 114–124. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.06.010>
- Sonaje, K., Chen, Y. J., Chen, H. L., Wey, S. P., Juang, J. H., Nguyen, H. N., ... Sung,

- H. W. (2010). Enteric-coated capsules filled with freeze-dried chitosan/poly( $\gamma$ -glutamic acid) nanoparticles for oral insulin delivery. *Biomaterials*, 31(12), 3384–3394. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.042>
- Song, J., Li, S., Zhou, Y., Liu, J., Francois, S., Lu, M., ... Sutter, K. (2017). Different antiviral effects of IFN $\alpha$  subtypes in a mouse model of HBV infection. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00469-1>
- Songsurang, K., Praphairaksit, N., Siraleartmukul, K., & Muangsin, N. (2011). Electro spray fabrication of doxorubicin-chitosan-tripolyphosphate nanoparticles for delivery of doxorubicin. *Archives of Pharmacal Research*, 34(4), 583–592. <https://doi.org/10.1007/s12272-011-0408-5>
- Sorasitthiyankarn, F. N., Muangnoi, C., Ratnatilaka Na Bhuket, P., Rojsitthisak, P., & Rojsitthisak, P. (2018). Chitosan/alginate nanoparticles as a promising approach for oral delivery of curcumin diglutamic acid for cancer treatment. *Materials Science and Engineering C*, 93, 178–190. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.07.069>
- Sosnik, A. (2014). Production of drug-loaded polymeric nanoparticles by electro spraying technology. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, Vol. 10, pp. 2200–2217. <https://doi.org/10.1166/jbn.2014.1887>
- Spinner, C. D., Gottlieb, R. L., Criner, G. J., Arribas López, J. R., Cattelan, A. M., Soriano Viladomiu, A., ... Marty, F. M. (2020). Effect of Remdesivir vs Standard Care on Clinical Status at 11 Days in Patients with Moderate COVID-19: A Randomized Clinical Trial. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 324(11), 1048–1057. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.16349>
- Sprooten, J., Agostinis, P., & Garg, A. D. (2019). Type I interferons and dendritic cells in

cancer immunotherapy. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 348, pp. 217–262). <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2019.06.001>

Sreekumar, S., Lemke, P., Moerschbacher, B. M., Torres-Giner, S., & Lagaron, J. M. (2017). Preparation and optimization of submicron chitosan capsules by water-based electrospraying for food and bioactive packaging applications. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 34(10), 1795–1806. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1347284>

Sridhar, R., & Ramakrishna, S. (2013). Electrosprayed nanoparticles for drug delivery and pharmaceutical applications. *Biomatter*, Vol. 3. <https://doi.org/10.4161/biom.24281>

Staehele, P. (1990). Interferon-Induced Proteins and the Antiviral State. *Advances in Virus Research*, 38(C), 147–200. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)60862-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60862-3)

Sun, Q., Sun, L., Liu, H. H., Chen, X., Seth, R. B., Forman, J., & Chen, Z. J. (2006). The Specific and Essential Role of MAVS in Antiviral Innate Immune Responses. *Immunity*, 24(5), 633–642. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.04.004>

Sutter, K., Dickow, J., & Dittmer, U. (2018, April 1). Interferon  $\alpha$  subtypes in HIV infection. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, Vol. 40, pp. 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2018.02.002>

Svenson, S., & Tomalia, D. A. (2012). Dendrimers in biomedical applications-reflections on the field. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 64, pp. 102–115. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.030>

- Taheri, A., & Jafari, S. M. (2019). Nanostructures of gums for encapsulation of food ingredients. In *Biopolymer Nanostructures for Food Encapsulation Purposes* (pp. 521–578). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815663-6.00018-5>
- Tamura, T., Yanai, H., Savitsky, D., & Taniguchi, T. (2008). The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annual Review of Immunology*, Vol. 26, pp. 535–584. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090400>
- Tan, S. L., & Katze, M. G. (1999). The emerging role of the interferon-induced PKR protein kinase as an apoptotic effector: A new face of death? *Journal of Interferon and Cytokine Research*, Vol. 19, pp. 543–554. <https://doi.org/10.1089/107999099313677>
- Thitinan, S., & McConville, J. T. (2009, March 18). Interferon alpha delivery systems for the treatment of hepatitis C. *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 369, pp. 121–135. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.11.027>
- Thompson, P. A., & Ravandi, F. (2017). How I manage patients with hairy cell leukaemia. *British Journal of Haematology*, 177, 543–556. <https://doi.org/10.1111/bjh.14524>
- Tiğli Aydın, R. S., & Pulat, M. (2012). 5-fluorouracil encapsulated chitosan nanoparticles for pH-stimulated drug delivery: Evaluation of controlled release kinetics. *Journal of Nanomaterials*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/313961>
- Tomasello, E., Pollet, E., Vu Manh, T. P., Uzé, G., & Dalod, M. (2014). Harnessing mechanistic knowledge on beneficial versus deleterious IFN-I effects to design innovative immunotherapies targeting cytokine activity to specific cell types. *Frontiers in Immunology*, 5(OCT), 526. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00526>

- Trinh, V. A., Zobniw, C., & Hwu, W. J. (2017). The efficacy and safety of adjuvant interferon-alfa therapy in the evolving treatment landscape for resected high-risk melanoma. *Expert Opinion on Drug Safety*, Vol. 16, pp. 933–940.  
<https://doi.org/10.1080/14740338.2017.1343301>
- Troeger, C., Blacker, B., Khalil, I. A., Rao, P. C., Cao, J., Zimsen, S. R. M., ... Reiner, R. C. (2018). Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(11), 1191–1210. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30310-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30310-4)
- Valo, H., Peltonen, L., Vehviläinen, S., Karjalainen, M., Kostianen, R., Laaksonen, T., & Hirvonen, J. (2009). Electro spray encapsulation of hydrophilic and hydrophobic drugs in poly(L-lactic acid) nanoparticles. *Small*, 5(15), 1791–1798.  
<https://doi.org/10.1002/smll.200801907>
- Varadan, V. K., Chen, L., & Xie, J. (2008). *Nanomedicine : design and applications of magnetic nanomaterials, nanosensors and nanosystems*. Wiley.
- Varde, N. K., & Pack, D. W. (2004, January). Microspheres for controlled release drug delivery. *Expert Opinion on Biological Therapy*, Vol. 4, pp. 35–51.  
<https://doi.org/10.1517/14712598.4.1.35>
- Vauthier, C., & Bouchemal, K. (2009). Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, Vol. 26, pp. 1025–1058.  
<https://doi.org/10.1007/s11095-008-9800-3>
- Vermehren, J., & Sarrazin, C. (2011, July 25). New hepatitis C therapies in clinical development. *European Journal of Medical Research*, Vol. 16, pp. 303–314.

<https://doi.org/10.1186/2047-783x-16-7-303>

Vianey, G.-B. B., Eli, O.-G. B., Guillermina, F.-F., Enrique, M.-A., Alejandra, A.-C., & Laura, J.-A. (2017). Multimeric System of RGD-Grafted PMMA-Nanoparticles as a Targeted Drug- Delivery System for Paclitaxel. *Current Pharmaceutical Design*, 23(23). <https://doi.org/10.2174/1381612823666170407143525>

Villela, S. M. A., Kraïem, H., Bouhaouala-Zahar, B., Bideaux, C., Lara, C. A. A., & Fillaudeau, L. (2020). A protocol for recombinant protein quantification by densitometry. *MicrobiologyOpen*, 9(6), 1175–1182. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1027>

Wagle, S. R., Kovacevic, B., Walker, D., Ionescu, C. M., Shah, U., Stojanovic, G., ... Al-Salami, H. (2020, October 2). Alginate-based drug oral targeting using bio-micro/nano encapsulation technologies. *Expert Opinion on Drug Delivery*, Vol. 17, pp. 1361–1376. <https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1789587>

Wang, B. X., & Fish, E. N. (2019, June 1). Global virus outbreaks: Interferons as 1st responders. *Seminars in Immunology*, Vol. 43, p. 101300. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.101300>

Wang, C., Pflugheber, J., Sumpter, R., Sodora, D. L., Hui, D., Sen, G. C., & Gale, M. (2003). Alpha Interferon Induces Distinct Translational Control Programs To Suppress Hepatitis C Virus RNA Replication. *Journal of Virology*, 77(7), 3898–3912. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.7.3898-3912.2003>

Wang, Jiamian, Jansen, J. A., & Yang, F. (2019). Electrospraying: Possibilities and challenges of engineering carriers for biomedical applications - a mini review. *Frontiers in Chemistry*, Vol. 7. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00258>

- Wang, Junzhi, Larocque, L., Bliu, A., Xu, R., Diress, A., Lin, R., ... Li, X. (2011). Bioactivity determination of native and variant forms of therapeutic interferons. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/174615>
- Werner, R. N., Westfechtel, L., Dressler, C., & Nast, A. (2017). Anogenital warts and other HPV-associated anogenital lesions in the HIV-positive patient: a systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of interventions assessed in controlled clinical trials. *Sex Transm Infect*, 93, 543–550. <https://doi.org/10.1136/sextrans>
- Wetzke, M., & Schwerk, N. (2019, July 1). Respiratory syncytial virus infections. *Pneumologe*, Vol. 16, pp. 232–241. <https://doi.org/10.1007/s10405-019-0252-8>
- Wimardani, Y. S., Suniarti, D. F., Freisleben, H.-J., Wanandi, S. I., Ikeda, M.-A., & Wimardhani, Y. S. (2012). Cytotoxic effects of chitosan against oral cancer cell lines is molecular-weight-dependent and cell-type-specific. *Original Article International Journal of Oral Research*. Retrieved from [www.ijoronline.com](http://www.ijoronline.com)
- Wira, C. R., Patel, M. V, Ghosh, M., Mukura, L., & Fahey, J. V. (2011). Innate Immunity in the Human Female Reproductive Tract: Endocrine Regulation of Endogenous Antimicrobial Protection Against HIV and Other Sexually Transmitted Infections. *American Journal of Reproductive Immunology*, Vol. 65, pp. 196–211. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2011.00970.x>
- Witte, K., Witte, E., Sabat, R., & Wolk, K. (2010). IL-28A, IL-28B, and IL-29: Promising cytokines with type I interferon-like properties. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, Vol. 21, pp. 237–251. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2010.04.002>

- Wong, P. T., & Choi, S. K. (2015, May 13). Mechanisms of Drug Release in Nanotherapeutic Delivery Systems. *Chemical Reviews*, Vol. 115, pp. 3388–3432. <https://doi.org/10.1021/cr5004634>
- Woo, A. S. J., Kwok, R., & Ahmed, T. (2017). Alpha-interferon treatment in hepatitis B. *Annals of Translational Medicine*, Vol. 5. <https://doi.org/10.21037/atm.2017.03.69>
- Wu, J., Wang, Y., Yang, H., Liu, X., & Lu, Z. (2017). Preparation and biological activity studies of resveratrol loaded ionically cross-linked chitosan-TPP nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 175, 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.07.058>
- Wu, Y., Duong, A., James, L., & E., B. (2012). Electrospray Production of Nanoparticles for Drug/Nucleic Acid Delivery. *The Delivery of Nanoparticles*. <https://doi.org/10.5772/36672>
- Xu, L., Yang, L., & Liu, W. (2013). Distinct evolution process among type I interferon in mammals. *Protein and Cell*, 4(5), 383–392. <https://doi.org/10.1007/s13238-013-3021-1>
- Xu, Y., & Hanna, M. A. (2006). Electrospray encapsulation of water-soluble protein with polylactide. Effects of formulations on morphology, encapsulation efficiency and release profile of particles. *International Journal of Pharmaceutics*, 320(1–2), 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.03.046>
- Yan, N., & Chen, Z. J. (2012). *Intrinsic antiviral immunity*. <https://doi.org/10.1038/ni.2229>
- Yang, F., Song, F. L., Pan, Y. F., Wang, Z. Y., Yang, Y. Q., Zhao, Y. M., ... Zhang, Y. M. (2010). Preparation and characteristics of interferon-alpha poly(lactic-co-glycolic

acid) microspheres. *Journal of Microencapsulation*, 27(2), 133–141.

<https://doi.org/10.3109/02652040903052010>

Yang, L., Yang, W., Bi, D., & Zeng, Q. (2006). A novel method to prepare highly encapsulated interferon- $\alpha$ -2b containing liposomes for intramuscular sustained release. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 64(1), 9–15.

<https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2006.03.003>

Ye, C., & Chi, H. (2018, February 1). A review of recent progress in drug and protein encapsulation: Approaches, applications and challenges. *Materials Science and Engineering C*, Vol. 83, pp. 233–246. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.10.003>

Ye, X., Wang, Q., & Wang, H. (2019). New era of drug innovation in China. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 9(5), 1084–1085.

<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.06.002>

Yim, E. K. F., Reano, R. M., Pang, S. W., Yee, A. F., Chen, C. S., & Leong, K. W. (2005). Nanopattern-induced changes in morphology and motility of smooth muscle cells. *Biomaterials*, 26(26), 5405–5413.

<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.01.058>

Ylitalo, R., Lehtinen, S., Wuolijoki, E., Ylitalo, P., & Lehtimäki, T. (2002). Cholesterol-lowering properties and safety of chitosan. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*, Vol. 52, pp. 1–7. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1299848>

Yokoyama, M. (2010). Polymeric micelles as a new drug carrier system and their required considerations for clinical trials. *Expert Opinion on Drug Delivery*, Vol. 7, pp. 145–158. <https://doi.org/10.1517/17425240903436479>

- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., ... Fujita, T. (2005). Shared and Unique Functions of the DExD/H-Box Helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in Antiviral Innate Immunity. *The Journal of Immunology*, 175(5), 2851–2858. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.5.2851>
- Younes, H. M., & Amsden, B. G. (2002). Interferon- $\gamma$  therapy: Evaluation of routes of administration and delivery systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 91, pp. 2–17. <https://doi.org/10.1002/jps.10007>
- Yu, M., Ng, B. C., Rome, L. H., Tolbert, S. H., & Monbouquette, H. G. (2008). Reversible pH Lability of Cross-linked Vault Nanocapsules. *Nano Letters*, 8(10), 3510–3515. <https://doi.org/10.1021/nl080536z>
- Zamani, M., Prabhakaran, M. P., & Ramakrishna, S. (2013). Advances in drug delivery via electrospun and electrosprayed nanomaterials. *International Journal of Nanomedicine*, Vol. 8, pp. 2997–3017. <https://doi.org/10.2147/IJN.S43575>
- Zazo, H., Colino, C. I., & Lanao, J. M. (2016). Current applications of nanoparticles in infectious diseases. *Journal of Controlled Release*, Vol. 224, pp. 86–102. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.008>
- Zeuzem, S., Sulkowski, M. S., Lawitz, E. J., Rustgi, V. K., Rodrigueztorres, M., Bacon, B. R., ... McHutchison, J. G. (2010). Albinterferon alfa-2b was not inferior to pegylated interferon- $\alpha$  in a randomized trial of patients with chronic hepatitis C virus genotype 1. *Gastroenterology*, 139(4), 1257–1266. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.06.066>
- Zhang, C., Chang, M. W., Ahmad, Z., Hu, W., Zhao, D., & Li, J. S. (2015). Stable single device multi-pore electrospraying of polymeric microparticles via controlled

electrostatic interactions. *RSC Advances*, 5(107), 87919–87923.

<https://doi.org/10.1039/c5ra18482g>

Zhang, S., & Kawakami, K. (2010). One-step preparation of chitosan solid nanoparticles by electrospray deposition. *International Journal of Pharmaceutics*, 397(1–2), 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.07.007>

Zhang, T., Liu, Y., Yu, H., Li, S., Chen, H., & Hu, Q. (2016). Bio-electrospraying of human umbilical vein endothelial cells with a customized multi-hole spinneret. *Key Engineering Materials*, 705, 291–296.

<https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.705.291>

Zhao, H., Kurbanov, F., Wan, M. Bin, Yin, Y. K., Niu, J. Q., Hou, J. L., ... Si, C. W. (2007). Genotype B and younger patient age associated with better response to low-dose therapy: A trial with pegylated/nonpegylated interferon- $\alpha$ -2b for hepatitis B e antigen-positive patients with chronic hepatitis B in China. *Clinical Infectious Diseases*, 44(4), 541–548. <https://doi.org/10.1086/511042>

Zhao, W., Cha, E. N., Lee, C., Park, C. Y., & Schindler, C. (2007). Stat2-Dependent Regulation of MHC Class II Expression. *The Journal of Immunology*, 179(1), 463–471. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.1.463>

Zhou, A., Hassel, B. A., & Silverman, R. H. (1993). Expression cloning of 2-5A-dependent RNAase: A uniquely regulated mediator of interferon action. *Cell*, 72(5), 753–765. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90403-D](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90403-D)

Zhuang, C. Y., Li, N., Wang, M., Zhang, X. N., Pan, W. S., Peng, J. J., ... Tang, X. (2010). Preparation and characterization of vinpocetine loaded nanostructured lipid carriers (NLC) for improved oral bioavailability. *International Journal of*

*Pharmaceutics*, 394(1–2), 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.05.005>