



“Evaluación de los sistemas de producción utilizados en el desarrollo del IFN y humano recombinante y la relación que tienen con la toxicidad generada por el producto”

Acuña Mondragón, María José

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 Ingeniera en Biotecnología

Ramos Gómez, Thelvia Isabel PhD (c)

13 de septiembre de 2021

Resultado del análisis de Urkund




Document Information

Analyzed document	Acuña_MaJose_Trabajo_de_titulación 10092021 Urkund.docx (D112512321)
Submitted	9/13/2021 8:48:00 PM
Submitted by	Nelson Vispo
Submitter email	nvispo@yachaytech.edu.ec
Similarity	0%
Analysis address	nvispo.yachay@analysis.orkund.com

Sources included in the report

THELVIA
ISABEL
RAMOS
GOMEZ



Firmado
digitalmente por
THELVIA ISABEL
RAMOS GOMEZ
Fecha: 2021.09.13
14:09:21 -05'00'



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “Evaluación de los sistemas de producción utilizados en el desarrollo del IFN y humano recombinante y la relación que tienen con la toxicidad generada por el producto” fue realizado por la señorita Acuña Mondragón, María José, el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 13 de septiembre de 2021

THELVIA
ISABEL
RAMOS
GOMEZ

Firmado digitalmente
por THELVIA ISABEL
RAMOS GOMEZ
Fecha: 2021.09.13
18:21:41 -05'00'

Dra. Ramos Gómez, Thelvis Isabel PhD (c)
Directora
C. C. 1753960028



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Acuña Mondragón, María José**, con cédula de ciudadanía n° 1724393077, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“Evaluación de los sistemas de producción utilizados en el desarrollo del IFN y humano recombinante y la relación que tienen con la toxicidad generada por el producto”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 13 de septiembre de 2021

Acuña Mondragón, María José

C.C.:1724393077



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo, **Acuña Mondragón, María José**, con cédula de ciudadanía n° 1724393077, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: **“Evaluación de los sistemas de producción utilizados en el desarrollo del IFN y humano recombinante y la relación que tienen con la toxicidad generada por el producto”**, en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi/nuestra responsabilidad.

Sangolquí, 13 de septiembre de 2021

Acuña Mondragón, María José

C.C.:1724393077

Dedicatoria

A Dios por nunca soltarme.

A mi niña interior por nunca darse por vencida.

A mi padre por enseñarme a ser resiliente y valiente.

A mis abuelitos que al igual que mi padre me acompañan desde el cielo en cada paso que doy, colmándome de bendiciones.

Agradecimientos

A mi familia, en especial a mis padres José Alberto Acuña y Patricia Mondragón por todo su amor, por guiarme y nunca soltarme en este camino, por su apoyo y su dedicación al enseñarme a ser un buen ser humano. A mi hermana por los ejemplos brindados y por sostenerme en las adversidades. A mis tíos y primos por sus bendiciones y preocupación en cada etapa de mi vida.

A la Dra. Thelvia Ramos y al Dr. Nelson Vispo por el apoyo académico, su aporte en mi desarrollo profesional y por la paciencia al compartir sus conocimientos.

A Adrian por su amor, por creer en mí, por ser mi compañero de aventuras, de risas, juegos y llantos, le agradezco el apoyo brindado desde que entro en mi vida y en la realización de este trabajo.

A mis amigos por los lazos formados y el apoyo en esta etapa Universitaria, en especial a Karol Balseca y Lorena Troya por todas las metas que hemos alcanzado juntas. Agradezco sobremanera a Beatriz Rojas por ser mi amiga de toda la vida, por todo el apoyo tanto en los buenos y malos momentos de nuestras vidas.

Índice de contenido

Resultado del análisis de Urkund	2
Certificación	3
Responsabilidad de autoría	4
Autorización de publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos.....	7
Listado de tablas	10
Listado de figuras	11
Listado de abreviaturas	12
Resumen.....	14
Abstract.....	15
Capítulo I: Introducción.....	16
Formulación del problema y antecedentes	16
Justificación del problema	18
Objetivos	21
Objetivo General.....	21
Objetivos Específicos	21
Capítulo II: Marco teórico	22
Interferón.....	22
Tipos de interferón.....	23
IFN γ	25
IFN γ 1B	28
Sistemas de expresión del rhIFN γ	29
Capítulo III: Materiales y métodos	32

Búsqueda preliminar de información.....	32
Selección y clasificación de estudios primordiales.....	33
Organización y unificación de datos	34
Programas para la elaboración de figuras	34
BioRENDER	34
Capítulo IV: Resultados y Discusión.....	36
Búsqueda preliminar de información.....	36
Selección y clasificación de estudios primordiales.....	36
Organización y unificación de datos	37
Capítulo VI: Conclusiones	54
Capítulo VII: Recomendaciones	55
Bibliografía	56

Listado de tablas

Tabla 1	Sistemas de expresión probados en la producción de rhIFN y	30
Tabla 2	Palabras utilizadas en la exploración de artículos de investigación	32
Tabla 3	Criterios de elegibilidad para la información en la revisión sistemática.....	33
Tabla 4	Sistemas de producción encontrados para el desarrollo de rhIFN y	38

Listado de figuras

Figura 1 Señales de transducción por los receptores de IFNs tipo I, II y III.....	23
Figura 2 Vía de señalización de IFN γ	27
Figura 3 Resultados de artículos científicos encontrados en las diferentes bases de datos seleccionadas	36
Figura 4 Resultados de la producción de IFN γ humano recombinante en diferentes sistemas de expresión.....	37

Listado de abreviaturas

IFN γ : Interferón Gama

IFN: Interferón

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

rhIFN γ : Interferón Gamma Recombinante

FDA: Food and Drug Administration

CHO: Célula de Ovario de Hámster Chino

PTM: Modificación Postraduccional

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos

TLR: Receptores tipo TOLL

ISG: Genes estimulados por interferón

JAK: Janus quinasa

STAT: Transductor de señal y activador de la transcripción

IFN α R1: Receptor de interferón alfa 1

IFN α R2: Receptor de interferón alfa 2

DAMPs: Patrones moleculares asociados a daños

MAPK/JNK: Proteína quinasa activa por mitógenos/c Jun N terminal quinasa

IFNLR1: Receptor 1 de interferón lambda

NK: Natural Killer

ILC: Células linfoides innatas

NKT: Natural Killer T

APCs: Células presentadoras de antígeno

IFNGR: Receptor de interferón gamma

STAT1: Transductor de señal y activador de la transcripción 1

GAS: Sitio de activación de interferón gamma

IRF9: Factor regulado por interferón nueve

ISGF3: Factor tres de los genes estimulados por el interferón

ROS: Especies reactivas de oxígeno

DC: Células dendríticas

IIRMI: Impurezas modificadoras de la respuesta inmune innata

CAI: Índice de adaptación de codones

MBP: Proteína de unión a maltosa

Resumen

Los interferones (IFN) son citocinas capaces de mediar respuestas tanto en la inmunidad innata como adaptativa y son conocidos por sus efectos antivirales. El IFN γ humano recombinante (rhIFN γ) ha sido estudiado en diversas patologías. Además, se ha visto un crecimiento potencial en el mercado debido a la demanda de antiretrovirales por la pandemia. Este biofármaco en la actualidad se produce a escala industrial solo en *Escherichia coli*, siendo importante el análisis de los sistemas de expresión utilizados en el laboratorio para la producción de rhIFN γ . En vista de que cada sistema de expresión posee diferentes características, el objetivo del presente trabajo es evaluar diferentes sistemas de producción utilizados en el desarrollo de rhIFN γ y su relación con la toxicidad generada por el producto. La revisión sistemática se llevó a cabo mediante cuatro repositorios digitales siendo Google académico la base de datos con más resultados. Se encontró que el sistema de expresión basado en levaduras fue el más investigado; sin embargo *E. coli* mostró los mejores rendimientos en la producción de la proteína diana. Determinando que la coexpresión con proteínas auxiliares o transportadoras y la glicosilación no afecta a la bioactividad de rhIFN γ . Los efectos secundarios los síntomas similares a la gripe dependen de la toxicidad intrínseca de *E. coli* y su método de purificación puede desencadenar trastornos cardiovasculares y renales. La purificación está en dependencia de la cantidad de impurezas en cada sistema de expresión capaces de levantar una respuesta inmunitaria innata.

Palabras clave:

- BACTERIAS
- CÉLULAS DE ORGANISMOS SUPERIORES
- LEVADURAS
- EVENTOS ADVERSOS

Abstract

Interferons (IFNs) are cytokines capable of mediating responses not only in innate but also in adaptive immunity and they are known for their antiviral effects. Recombinant human γ IFN (rhIFN γ) has been studied in several pathologies. In addition, it has seen potential growth in the market due to the demand for antiretrovirals due to the pandemic. This biopharmaceutical is currently produced on an industrial scale only in *Escherichia coli*, it is therefore important the analysis of the expression systems used in the laboratory to produce rhIFN γ . In view of the fact that each expression system has different characteristics, the objective of this work is to evaluate different production systems used in the development of rhIFN γ and its relationship with the toxicity generated by the product. The systematic review was carried out through four digital repositories with Google scholar being the database with the most results. It was found that the yeast-based expression system was the most researched; however, *E. coli* showed the best yields in the production of the target protein. Determining that co-expression with auxiliary or transporter proteins and glycosylation does not affect the bioactivity of rhIFN γ . Side effects flu-like symptoms depend on the intrinsic toxicity of *E.coli* and its purification method can trigger cardiovascular and renal disorders. Purification is dependent on the amount of impurities in each expression system capable of raising an innate immune response.

Keywords

- BACTERIA
- SUPERIOR ORGANISMS CELLS
- YEASTS
- ADVERSE EVENTS

Capítulo I: Introducción

Formulación del problema y antecedentes

Las citocinas como el interferón γ (IFN γ) son proteínas de señalización encargadas de regular las respuestas inmunitarias y se producen por células inmunológicas (Arango & Descoteaux, 2014; Katsuyama & Moulton, 2021). Los interferones fomentan respuestas inmunológicas innatas y adaptativas (Borden, 2015), contra una serie de patógenos y otros estímulos (Abdolvahab et al., 2020; Graber & Dhib-Jalbut, 2014). Estas moléculas poseen efectos antivirales, antitumorales e inmunomoduladores (Kline & Kitagaki, 2006).

En 1930, Hoskins demostró una interferencia viral en conejos infectados previamente con el virus del herpes simple, describiendo por primera vez la función del interferón (IFN) (Ferreira et al., 2019). Más tarde, en 1957 Isaacs y Lindenmann evidenciaron mediante cultivos celulares la existencia de una molécula capaz de proteger y producir interferencia viral a otras células frente a diferentes virus (Isaacs & Lindenmann, 1957). La caracterización físicoquímica del IFN en 1978 desde los avances en herramientas como la Biología Molecular que hicieron posible la identificación de dos moléculas, conocidas como IFN tipo I e IFN tipo II (L. Castro et al., 2021; Ferreira et al., 2019; Pestka et al., 2004).

Existen tres tipos de interferón (IFN tipo I, II y III) (Negishi et al., 2018; Rönnblom & Leonard, 2019), clasificados de acuerdo a la secuencia de nucleótidos, ubicación cromosómica, estructura, interacción con receptores específicos y propiedades físicoquímicas (Bandurska et al., 2014). La única citoquina en el tipo II es el IFN γ (Ferreira et al., 2019), un potente inmunomodulador relacionado con la activación de macrófagos (Kak et al., 2018; Miller et al., 2009). Rige la expresión de un regulador de

la transcripción de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) II, conocido como transactivador de clase II, regulando positivamente el procesamiento y la presentación de antígenos mediante MHC II (Borden et al., 2007). El IFN γ produce efectos antiproliferativos, antivirales y antibacterianos, pero su principal función es la inmunoregulación que ejerce al servir como puente entre la inmunidad innata y adaptativa, con la capacidad de disminuir las acciones inmunopatogénicas y los daños colaterales (Lee & Ashkar, 2018); razón por la cual ha sido considerado un blanco terapéutico para diferentes patologías (F. Castro et al., 2018).

El primer ensayo clínico de esta proteína se realizó en 1986, y en 1990, se obtuvo la molécula de interferón γ humano recombinante (rhIFN γ) aprobada por la Food and Drug Administration (FDA). Esta proteína apareció en el mercado farmacéutico con el nombre de Actimmune (IFN γ 1b), proteína recombinante producida en *Escherichia coli* como sistema de expresión (Horizon Pharma Ireland Ltd, 2016). En la actualidad la formulación de rhIFN γ se comercializa con distintos nombres como: Immukin, Imufor, Imukin (Weiner & Buhimschi, 2009) y se encuentran aprobados para su uso en osteopetrosis maligna grave y enfermedad granulomatosa crónica (Lyseng, 2015; Razaghi et al., 2016) entre otras afecciones. Este biofármaco se ha probado en cáncer (Kak et al., 2018), tuberculosis (T. A. Khan et al., 2016), distintos tipos de hepatitis (Muir et al., 2006), esclerodermia (Avau & Matthys, 2015), fibrosis pulmonar idiopática (Bello-Rivero et al., 2018), fibrosis quística (Moss et al., 2005), infecciones fúngicas invasivas (Razaghi et al., 2016), artritis reumatoide (Miller et al., 2009), etc. En Ecuador esta biomolécula no se encuentra disponible, pero sí el IFN α y β expresados en *E. coli* y células de ovario de hámster chino (CHO) respectivamente (ARCSA, 2021).

Los biofármacos se expresan en bacterias y sistemas biológicos eucarióticos; como pueden ser hongos, líneas celulares de mamíferos, líneas celulares vegetales, insectos, animales y plantas transgénicas (Puetz & Wurm, 2019). *E. coli* es el hospedero más utilizado y la producción rhIFN γ en esta plataforma posee múltiples desventajas incluyendo, formación de cuerpos de inclusión lo cual conlleva a la desnaturalización de la proteína parcial o total, aumentando un paso extra en la etapa de purificación (Razaghi et al., 2016). La estructura secundaria, estabilidad del ARN, inicio y velocidad de traducción, y la incorporación de aminoácidos se pueden ver afectados por el uso de codones raros (Harris & Kilby, 2014; Menzella, 2011). Además, existen cuellos de botella debido a la contaminación con endotoxinas y ácidos nucleicos, lo que en definitiva genera un sobreprecio en la producción del biofármaco (Heidari et al., 2019; R. Pandey & Veeranki, 2018). A diferencia del IFN γ nativo que posee dos sitios de glicosilación ligados a N en las posiciones 25 y 97 de los residuos de asparagina, en *E. coli*, la plataforma de producción de IFN γ 1b, esta modificación postraduccional (PTM) no está presente (Razaghi et al., 2016). La falta de glicosilación en este biofármaco altera el tiempo de vida media pero no su bioactividad, la molécula queda más expuesta a la degradación proteolítica (Alspach et al., 2019). Esto ocasiona la necesidad de inyecciones más frecuentes y efectos secundarios más fuertes. Resultando importante analizar los diferentes sistemas de expresión empleados para la producción de rhIFN γ , así como la toxicidad producida.

Justificación del problema

La tecnología de ADN recombinante juega un papel importante para mejorar las condiciones de salud a través del desarrollo de proteínas de interés farmacéutico (S. Khan et al., 2016; Nambisan, 2017). De tal forma que, la industria farmacéutica de proteínas recombinantes abarca aproximadamente el 10 % de todo el mercado de

medicamentos y se espera que el mercado global de productos biofarmacéuticos crezca con una tasa de crecimiento anual compuesta del 13.8% hasta el 2025 (Owczarek et al., 2019). De forma específica, el mercado mundial de IFN de 1986 a 1992 creció en aproximadamente \$ 740 millones, en el 2019 llegó a \$ 6.9 mil millones y para el 2020 se evaluó un crecimiento de hasta \$ 7.5 mil millones por la demanda de antiretrovirales en el tratamiento para COVID-19 (L. Castro et al., 2021).

Los productos de origen biológico, también conocidos como biofarmaceúticos, bioterapéuticos o biológicos son un grupo diverso de compuestos y suelen ser moléculas complejas y grandes, como anticuerpos monoclonales, proteínas terapéuticas y vacunas (FDA, 2018); se producen a partir de fuentes vivas como líneas celulares, microorganismos, plantas o animales (Jozala et al., 2016). Cada sistema de expresión posee fortalezas y debilidades y su elección dependerá de las propiedades de la proteína diana, su estructura, actividad biológica y cuan bien caracterizada se encuentre (Owczarek et al., 2019; Rosano & Ceccarelli, 2014).

E. coli expresa de forma adecuada proteínas < 60 kDa y aunque esta plataforma no genera PTM el desarrollo de la cepa SHuffle contribuyó al plegamiento de proteínas que posean puentes disulfuro, estabilizando la estructura proteica (Rosano & Ceccarelli, 2014). La función *in vivo*, vida media plasmática y prevención de reacciones inmunológicas pueden estar relacionadas con una adecuada N-glicosilación de la biomolécula (Amann et al., 2019). La ingeniería genética ha permitido abarcar varias estrategias para remediar la deficiencia de esta PTM en *E. coli* mediante procesamiento *in vitro* en sitios de glicosilación reemplazados con cisteína o inserción de genes capaces de codificar enzimas utilizadas en la biosíntesis de glucanos (Kamionka, 2011; Mueller et al., 2018). Los sistemas de expresión basados en levaduras generan

productos con pesos moleculares > 50 kDa y con glicosilación (Ma et al., 2020). Las líneas celulares de mamíferos son capaces de expresar proteínas grandes y complejas con PTM igual a las proteínas humanas, lo que sin duda mejora el uso en las aplicaciones clínicas (Owczarek et al., 2019).

La producción de proteínas terapéuticas recombinantes da lugar a reacciones inmunogénicas de acuerdo al sistema de expresión, lo cual puede limitar la utilidad (S. Khan et al., 2016). Asimismo, la calidad, productividad y rendimiento resultan ejes cruciales cuando se va a seleccionar un hospedero (Adrio & Demain, 2010)

Las revisiones sistemáticas son una solución factible a la problemática de la extensa literatura científica, manteniendo actualizados a los investigadores con respecto a una temática específica (Tawfik et al., 2019). Este trabajo está dirigido a contribuir con una perspectiva más amplia de todos los sistemas de expresión utilizados para producir rhIFN γ y las posibles aplicaciones farmacológicas junto con los efectos secundarios que se puedan desarrollar. Estableciendo así un estudio previo para futuras investigaciones que tengan como propósito entender y plantear otros sistemas de expresión comerciales para IFN γ e implantar sistemas económicamente competitivos.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar los sistemas de producción utilizados en el desarrollo del IFN y humano recombinante y su relación con la toxicidad generada por el producto.

Objetivos Específicos

- Identificar los sistemas de expresión utilizados para el desarrollo de IFN y humano recombinante, sus ventajas y desventajas desde el punto de vista productivo.
- Comparar la toxicidad producida por el IFN y en correspondencia con el sistema de producción utilizado.

Capítulo II: Marco teórico

Interferón

Los interferones son glicoproteínas pertenecientes a la familia α helicoidales de citocinas (Borden, 2015), desempeñan un papel importante en las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas (De Weerd & Nguyen, 2012) y son conocidos por sus efectos antivirales (Ferreira et al., 2019). Poseen otras funciones, como efectos antiproliferativos e inmunomoduladores, con regulación positiva de MHC I y II, transducción de señales y activación de células inmunitarias (Feroze & Wang, 2018; Khanna & Gerriets, 2020).

La mayoría de células son capaces de producir IFNs, sin embargo, los monocitos proinflamatorios y las células dendríticas plasmocitoides son las células con mayor capacidad para producirlos (García, 2017). La expresión de IFNs se da como respuesta a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) detectados por receptores tipo Toll (TLRs) (Borden, 2015; S. Pandey et al., 2015). Los IFNs actúan en la señalización paracrina, cuando son secretados luego de una infección viral y se acoplan a receptores en la membrana celular de células vecinas. En la señalización autocrina se unen a receptores de superficie de la misma célula de la cual se produjeron (Lavigne et al., 2020).

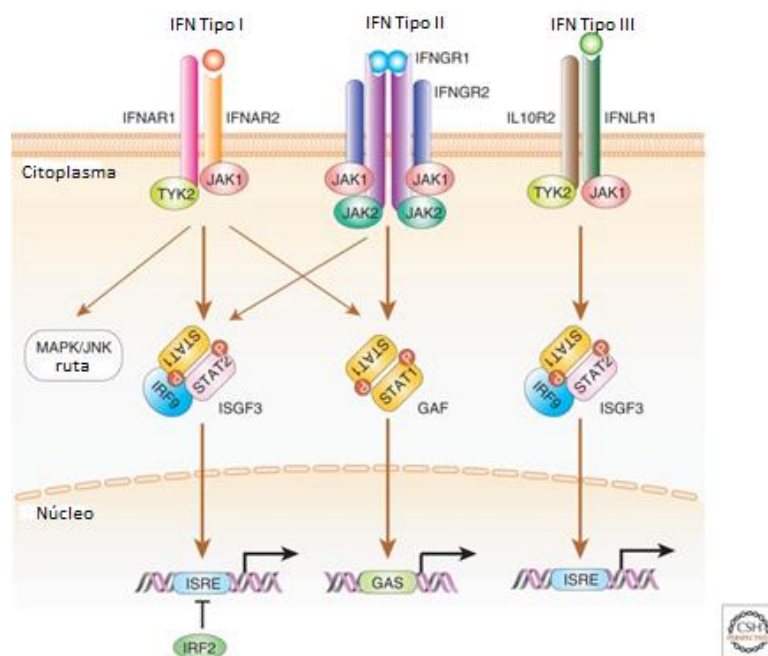
Los IFNs provocan la expresión de genes estimulados por interferón (ISG) (Schoggins, 2018). Las proteínas sintetizadas por estos genes poseen funciones antivirales, antiproliferativas y estimulantes de la inmunidad adaptativa, con la capacidad de actuar en conjunto o individualmente para lograr mejores resultados celulares de acuerdo a cada tipo de IFN (Schoggins, 2019).

Tipos de interferón

Los interferones se encuentran divididos en tres clases, tipo I, II y III y de forma general todos activan la vía de la quinasa Janus (JAK) junto con el transductor de señal y activador de la transcripción (STAT) (Razaghi et al., 2016), transcribiendo más de 500 a 1000 ISG (Figura 1) (Feng et al., 2018; Schoggins & Rice, 2011). Esta vía traduce un sinnúmero de señales a respuestas de homeostasis o desarrollo mediante la alteración de la expresión génica, iniciando con la activación de JAK una vez asociados los ligandos a sus receptores (S. C. Herrera & Bach, 2019). STAT son reclutados para su fosforilación y dimerización, seguido de su translocación al núcleo para unirse a regiones específicas del ADN y transcribir los ISG (Seif et al., 2017).

Figura 1

Señales de transducción por los receptores de IFNs tipo I, II y III.



Nota. Modificado de (Negishi et al., 2018)

La actividad antiviral es la principal función de los IFNs tipo I y III, pero de este último la actividad se genera a nivel de las mucosas (Donnelly & Kotenko, 2010; Lozhkov et al., 2020). Los IFNs α ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 8$, $\alpha 10$, $\alpha 13$, $\alpha 14$, $\alpha 16$, $\alpha 17$ y $\alpha 21$), β , ϵ , κ , ω pertenecen al tipo I (Q. Zhang et al., 2020). Todos los IFNs dentro de esta familia son expresados por un conjunto de genes presentes en el cromosoma 9 y poseen el mismo receptor el cual presenta dos subunidades, receptor de IFN α -1 (IFN α R1) y receptor de IFN α -2 (IFN α R2) (Figura 1) (Castro et al., 2018; Ferreira et al., 2019). Los leucocitos son las principales células encargadas de su producción y todas las células nucleadas responden ante su estímulo (Q. Zhang et al., 2020). Pueden ser inducidos por patrones moleculares asociados a daños (DAMPs) y PAMPs (Castro et al., 2018). Esta familia también puede impulsar la activación de la proteína quinasa activada por mitógenos / c Jun N terminal quinasa (MAPK/JNK) (Negishi et al., 2018).

El IFN λ perteneciente al tipo III consta de cuatro subtipos ($\lambda 1$, $\lambda 2$, $\lambda 3$ y $\lambda 4$) y fueron los últimos en descubrirse en el 2003 mediante predicciones computacionales (Hermant & Michiels, 2014). Los genes que expresan esta familia se encuentran en el cromosoma 19 (Wells & Coyne, 2018). Estas proteínas son estimuladas por la presencia de PAMPs o DAMPs y secretadas en mayor proporción por células dendríticas mieloides de tipo 2, además de células epiteliales (Syedbasha & Egli, 2017). El receptor del IFN λ está compuesto por dos subunidades, receptor 1 de IFN λ (IFNLR1) también conocido como IL-28R e IL-10R2 (Figura 1) (Kotenko et al., 2019; Zaroni et al., 2017), cuya expresión se encuentra restringida a células de la mucosa y otras superficies de barrera, así como a algunos tejidos incluyendo, células del intestino, hígado y pulmón (Negishi et al., 2018; Wells & Coyne, 2018).

IFN γ

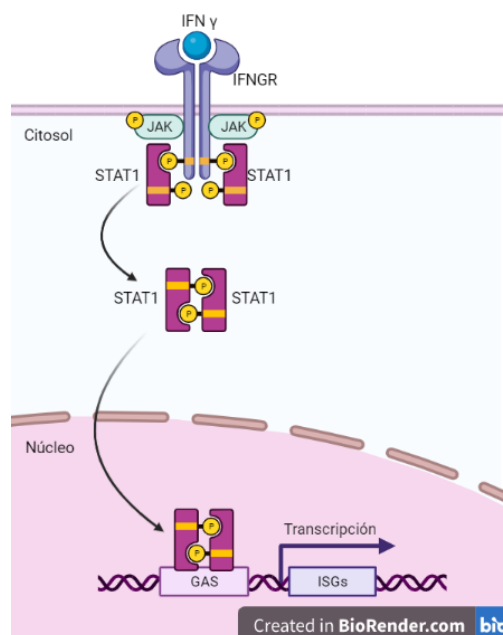
IFN γ es la única proteína en este tipo y se expresa a partir del gen IFNG el cual se encuentra en el cromosoma 12q15, cuenta con cuatro exones y tres intrones (Secombes & Zou, 2017; S. Wu et al., 2019) y una vez expresado da como resultado una proteína precursora con 166 aminoácidos que consta de un péptido señal de 22-23 aminoácidos y un propéptido (Carratalá et al., 2019). La estimulación para la secreción de esta proteína es mediada por la IL-12, IL-15, IL-18 y IL-21 (Jorgovanovic et al., 2020). La proteína madura es un homodímero de 143 aminoácidos (Zuber et al., 2016), con un peso alrededor de 37 kDa (Razaghi et al., 2016), unido de forma no covalente y una vez asociados los péptidos individuales toman una forma helicoidal, antiparalela formando una molécula compacta y globular (Alspach et al., 2019; X. Wang et al., 2020). Cada monómero contiene seis hélices α de entre 9 a 21 residuos (Lilkova et al., 2019; Zuber et al., 2016).

El IFN γ posee dos sitios de N-glicosilación en residuos de asparagina (Asn 25 y Asn 97) en cada monómero (X. Wang et al., 2020) y no posee enlaces disulfuro (Razaghi et al., 2016). El residuo N25 tiene modificaciones de tipo complejo fucosilados, mientras que N97 posee estructuras híbridas sin fucosilación y con alto contenido de manosa (Razaghi et al., 2016). La glicoproteína puede tener glicosilación en ambos sitios, estar monoglicosilada o sin glicosilación (Krachmarova et al., 2017), determinando así el peso molecular final (Jorgovanovic et al., 2020). La glicosilación en el IFN γ no interfiere con la actividad biológica; sin embargo, contribuye con la solubilidad e impide la degradación por proteasas (Jorgovanovic et al., 2020; Krachmarova et al., 2017).

Esta proteína es secretada tanto por células asesinas naturales (NK), células linfoides innatas (ILC), células T CD4⁺ y CD8⁺, células B, células T asesinas naturales (NKT) y células presentadoras de antígeno (APCs) (Castro et al., 2018; Ivashkiv, 2018). IFN γ se une a su receptor conocido con el nombre de receptor de IFN γ (IFNGR), un heterodímero con dos subunidades (IFNGR1 e IFNGR2) (Figura 1), pertenecientes a la familia tipo II de receptores de citocinas (Ferreira et al., 2019), con gran presencia tanto en células hematopoyéticas y no hematopoyéticas (Burke & Young, 2019; L. Castro et al., 2021). Cuando el IFN γ se une a su receptor IFNGR se produce la oligomerización de sus dos subunidades, activando quinasas Janus citoplasmáticas (JAK 1 y JAK 2) las cuales se encuentran asociadas al receptor, fosforilando y dimerizando el transductor de señal y activador de la transcripción uno (STAT1) (Jorgovanovic et al., 2020). Los homodímeros de STAT1 se translocan al núcleo en donde se unen al sitio de activación de IFN γ (GAS), iniciando la transcripción de genes estimulados por IFN γ (Ivashkiv, 2018; Jorgovanovic et al., 2020; Mojic et al., 2017). Los ISGs transcriben múltiples productos como factores antibacterianos, antivirales, quimiocinas, moléculas presentadoras de antígenos y receptores fagocíticos (Ivashkiv, 2018). Toda la vía de señalización se muestra en la Figura 2. Es importante considerar que el IFN γ también puede activar el factor tres de los genes estimulados por IFN (ISGF3), un complejo trimérico formado por STAT1, STAT2 e factor regulado por IFN 9 (IRF9) (Figura 1) pero en menor proporción que la vía que JAK/STAT1 (Negishi et al., 2018).

Figura 2

Vía de señalización de IFN γ .



NOTA. Elaborado mediante el programa BioRender.com

IFN γ desempeña un papel inmunomodulador, antiviral, antibacterial, antitumoral, antiproliferativo y antialérgico (Kak et al., 2018). Las células T que secretan IFN γ son capaces de potenciar la inmunidad innata, generando un vínculo entre la inmunidad innata y adaptativa (F. Castro et al., 2018). El incremento de la actividad de macrófagos, aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), mejora la regulación del MHC II para un adecuado proceso en la presentación de antígenos, así como el incremento en la producción de citocinas proinflamatorias y enzimas proteolíticas y autofagia (Kak et al., 2018; Ozcelik et al., 2020).

La expresión de MHC II mediada por IFN γ inicia la respuesta inmunológica frente a algunos tipos de cáncer (F. Castro et al., 2018). Es decir, los efectos

antitumorales mediados por IFN γ implican la regulación de expresión y presentación de antígenos, fomento de señales inflamatorias y quimiotácticas, mejora en la respuesta de los leucocitos y desencadenamiento de manera directa de los efectos antiproliferativos, como el incremento en la producción de mediadores apoptóticos (Burke & Young, 2019). IFN γ es crucial en la diferenciación de células dendríticas (DC) (Goldszmid et al., 2012), T CD8 citotóxicas (Curtsinger et al., 2012) y la activación de células T CD4 en las respuestas frente a patógenos (Haabeth et al., 2011). Debido a sus múltiples funciones el IFN γ ha sido desarrollado como una proteína recombinante y con el objetivo de mejorar sus características farmacodinámicas y farmacocinéticas se han investigado diversas plataformas de producción (L. Castro et al., 2021).

IFN γ 1B

Las proteínas recombinantes son aquellas originadas de forma artificial a través de la tecnología de ADN recombinante (Ferrer-Miralles et al., 2015). Esta biomolécula se produce industrialmente mediante esta técnica en *E. coli*, es decir, no presenta glicosilación, afectando las propiedades farmacocinéticas y fisicoquímicas (FDA, 2015; Razaghi et al., 2016). La proteína consta de 140 aminoácidos con peso molecular de 17 kDa en forma de monómero y 35 cuando está dimerizada (Horizon Pharma Ireland Ltd, 2016). Los cambios en las condiciones del bioproceso como temperatura, presión, densidad del cultivo entre otras, generan variabilidad de un lote a otro (Mockus et al., 2015), en el caso de IFN γ 1b la actividad biológica máxima descrita es de 3×10^6 UI/mg (Razaghi et al., 2016).

En la aplicación de este biofármaco se han identificado diversas reacciones adversas, las más frecuentes son síntomas similares a los de la gripe como fiebre, cefalea, escalofríos, fatiga, náuseas, vómito y diarrea (Lyseng, 2015). Los efectos

secundarios frecuentes incluyen depresión, dolor abdominal, mialgia, dolor de espalda (FDA, 2015). También existen reacciones con frecuencia desconocida como neutropenia, trombocitopenia, hiperglucemia, estado de confusión, desorientación, convulsiones, fallo cardíaco, enfermedad pulmonar intersticial, pancreatitis y fallo renal (Lyseng, 2015).

Sistemas de expresión del rhIFN γ

La producción de proteínas recombinantes se utiliza para generar una mayor producción de la proteína en relación a la que se obtendría de forma natural y además se requiere un alto nivel de pureza y calidad del péptido pues resulta esencial en el tratamiento de múltiples afecciones en los seres humanos (Tripathi & Shrivastava, 2019). En la actualidad existen múltiples sistemas de producción para la expresión de proteínas recombinantes como: bacterias, levaduras, hongos filamentosos, microalgas, líneas celulares de insectos, mamíferos, plantas, animales transgénicos y plantas transgénicas (Owczarek et al., 2019; Vieira et al., 2018). La calidad de la proteína, precio, funcionalidad, velocidad de producción y rendimiento son factores importantes a la hora de elegir el sistema de expresión más adecuado (Soares et al., 2018). Es importante tomar en cuenta algunos desafíos presentes en la producción de proteínas recombinantes como por ejemplo: la inactivación, desaparición o modificaciones a nivel estructural en el gen recombinante lo cual ocasiona la pérdida de expresión y por ende insuficiencia en la traducción (Brautaset & Valla, 2019; Gupta et al., 2016). También, las PTM como la glicosilación establecen la antigenicidad, actividad biológica, estabilidad, localización, plegamiento, tiempo de circulación y solubilidad debido a la sobreexpresión de la proteína recombinante (Gupta et al., 2016). Por lo mencionado antes es importante identificar los sistemas de expresión en los que se ha producido rhIFN γ , como Tabla 1.

La purificación es otro punto crítico a la hora de producir una proteína recombinante, este proceso muchas veces no es capaz de eliminar por completo impurezas como ADN, proteínas del hospedero o endotoxinas del producto, generando impurezas modificadoras de la respuesta inmune innata (IIRMI) (Verthelyi & Wang, 2010). Las IIRMI son capaces de estimular la inmunidad innata mediante su reconocimiento sobre todo por TLR, fomentando respuestas inmunitarias a la proteína terapéutica (Haile et al., 2015). Las respuestas inmunitarias a veces generan implicaciones clínicas incluyendo reacciones a la infusión, alteraciones en la farmacocinética de la biomolécula, neutralizan o comprometen la seguridad clínica y eficacia del biofármaco (Schellekens & Casadevall, 2004).

Tabla 1

Sistemas de expresión probados en la producción de rhIFN γ .

Sistemas de expresión	Actividad	Peso Molecular (kDa)
Glándula mamaria de ratón	1x10 ⁷ UI/mg	20-25
	1x10 ⁷ -5 x10 ⁷ UI/mL	
Células de rata	4 x10 ⁵ UI/mL	22-25
	2 x10 ⁴ -1 x10 ⁵ UI/mL	22-23
CHO	5.5 x10 ⁴ UI/mL	21-25
	1-2 x10 ⁸ UI/mg	20-26
<i>Spodoptera spp.</i>	Activo	18-23
<i>Solanum lycopersicum</i>	Activo	
<i>Oryzea sativa</i>	Activo	24-27
<i>Bacillus sp.</i>	Activo	17
<i>Leishmania</i>	Activo	17
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.5 x10 ⁴ UI/mL	
<i>Pichia pastoris</i>	Activo	

Sistemas de expresión	Actividad	Peso Molecular (kDa)
	Activo	17
	1-1.4 x10 ⁷ UI/mg	15
Células de mono	6.2 x10 ⁻² UI/mL	
Cultivo de tejido humano	1.93x10 ⁷ UI/mg	
<i>E. coli</i>	9x10 ⁷ UI/L	17

Nota. UI: Unidades Internacionales. Modificado de (Razaghi et al., 2016).

Capítulo III: Materiales y métodos

La presente revisión sistemática se basó en la declaración PRISMA, donde se encuentra especificado los elementos de informe preferidos para revisión sistemática y meta-análisis, con algunas modificaciones para mejorar el método (Moher et al., 2009; Tawfik et al., 2019).

Búsqueda preliminar de información

Luego de plantear el tema de investigación, se procedió a determinar las bases de datos en las cuales se buscaría la información necesaria mediante palabras claves, además se constató la existencia de suficientes artículos. Las bases de datos seleccionadas fueron, el buscador libre de la Biblioteca Nacional de Medicina de los Institutos Nacionales de Salud de EE. UU, PubMed, SciELO, ScienceDirect y Google Académico. La revisión bibliográfica se llevó a cabo utilizando tanto artículos en inglés como en español, la Tabla 3 se enlista las bases de datos y las palabras claves utilizadas.

Tabla 2

Palabras utilizadas en la exploración de artículos de investigación

Repositorios digitales	Palabras clave
PubMed	IFN y humano recombinante
SciELO	Producción de IFN y humano recombinante
ScienceDirect	IFN y humano recombinante efectos secundarios
Google Académico	Toxicidad del IFN y humano recombinante

Repositorios digitales	Palabras clave
	IFN y 1b

Selección y clasificación de estudios primordiales

La selección de los artículos se basó en el título y el resumen. Los artículos científicos encontrados tuvieron un primer filtro de acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión, los cuales se muestran en la Tabla 3, tomando en cuenta que el año se utilizó como una estrategia de búsqueda en los repositorios digitales. Además, para reducir el sesgo de la primera búsqueda, se realizó una búsqueda manual en los repositorios digitales seleccionados. Por otro lado, mediante el uso de una matriz en Excel se clasificó la información para descartar repeticiones y verificar el año de publicación. Las repeticiones se comprobaron en función del título, autor, año de publicación y revista.

Tabla 3

Criterios de elegibilidad para la información en la revisión sistemática

	Criterios de Inclusión	Criterios de Exclusión
Año	2016-2021	<2016
Accesibilidad	Artículos completos	Artículos duplicados
Relevancia en el tema de trabajo	Temas centrados en: Producción de IFN y en diferentes sistemas de expresión	Artículos irrelevantes

Criterios de Inclusión	Criterios de Exclusión
Toxicidad del IFN y humano recombinante en dependencia del sistema expresión	

Los artículos predeterminados fueron revisados mediante los criterios de inclusión y exclusión a fondo, con una lectura completa, para confirmar los documentos relevantes.

Organización y unificación de datos

Se clasificó la información en dos grupos, el primero abarcó el contenido respecto a sistemas de expresión de rhIFN y incluyendo bacterias, levaduras, células de organismos superiores y otros. Y por otro lado los documentos relacionados con la toxicidad del biofármaco.

Cuando los artículos fueron seleccionados, la información de interés se utilizó para realizar una revisión bibliográfica, ayudando a determinar la situación actual de los sistemas de expresión utilizados para la producción de IFN y humano recombinante.

Programas para la elaboración de figuras

Para casi todas las gráficas realizadas se utilizó el software Microsoft Excel, ya que es una herramienta accesible para el usuario y se utiliza para el análisis y visualización de datos.

BioRENDER

Es un programa en línea de uso libre utilizado para el diseño gráfico de figuras científicas. En la pantalla principal del software aparecen múltiples plantillas. La

plataforma es capaz de exportar los esquemas en múltiples formatos incluyendo jpg, png y pdf. Para la presente revisión la figura se descargó en formato png. Disponible en: <https://biorender.com/>

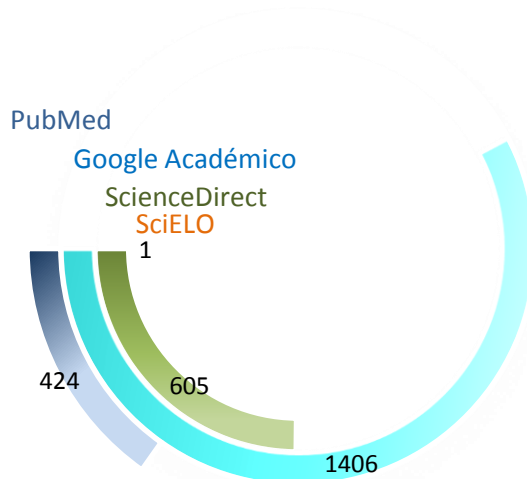
Capítulo IV: Resultados y Discusión

Búsqueda preliminar de información

En la presente revisión bibliográfica la búsqueda se realizó en cuatro bases de datos incluyendo Google académico, ScienceDirect, PubMed y SciELO, con un total de 2436 documentos localizados. En la Figura 3 se muestran los porcentajes de acuerdo al número de artículos científicos encontrados en cada base de datos. Siendo Google académico la base de datos con el mayor número de resultados.

Figura 3

Resultados de artículos científicos encontrados en las diferentes bases de datos seleccionadas



Selección y clasificación de estudios primordiales

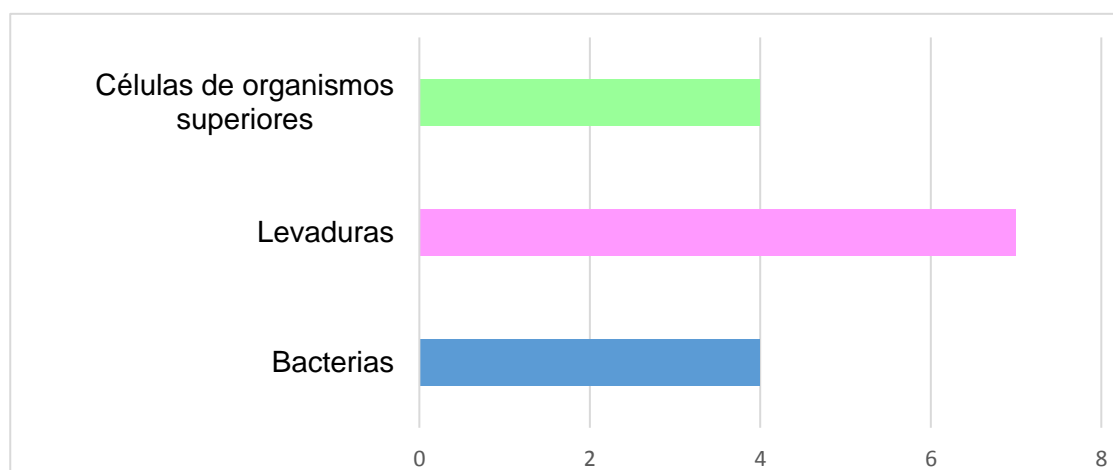
Una vez depurada la base de datos eliminando la información duplicada y aplicando los criterios de inclusión y exclusión. Los artículos científicos aptos para su uso en la revisión bibliográfica fueron 76.

Organización y unificación de datos

Las levaduras fueron los hospederos con el mayor número de investigaciones para la producción de IFN y humano recombinante como se puede apreciar en la Figura 4. Además, los artículos científicos relacionados con la producción de IFN y humano recombinante en diferentes bacterias y células de organismos superiores tuvieron igual número de documentos.

Figura 4

Resultados de la producción de IFN y humano recombinante en diferentes sistemas de expresión



Las diferentes plataformas utilizadas para la expresión de rhIFN y encontradas en esta revisión sistemática incluyeron organismos como: *E. coli*, *B. subtilis*, *P. pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *N. benthamiana* y *Nicotiana tabacum*. La Tabla 4 se indica los vectores, el tipo de expresión y los métodos de purificación utilizados en los artículos encontrados.

Tabla 4

Sistemas de producción encontrados para el desarrollo de rhIFN γ .

HOSPEDEROS	VECTOR	PROMOTOR	ECI	ECE	MÉTODOS DE PURIFICACIÓN
<i>E. coli</i>	p ET-28a(+)	T7-lac	X		IMAC e
<i>BL21 (DE3)</i>					ITC
<i>Bacillus sp</i> (WB800N)	pHT43	Pgrac		X	-----
<i>E. coli LE391</i>	pP1SD	P 1	X		-----
<i>E. coli GALG20 (DE3)</i>	pET28a	T7-lac	X		-----
<i>P. pastoris</i>	p PIC9K	AOX1		X	IMAC
	p KANB			X	Ni-NTA
	p PICZB			X	
<i>K. lactis</i>	p KLAC2	P LAC4-PBI		X	-----
<i>P. pastoris X-33</i>	pPICZ α B	AOX1		X	Ni-REM
<i>P. pastoris GS115</i>	pPICZ α A	AOX		X	IMAC
<i>P. pastoris</i>	pPICZ α A	AOX1		X	-----
<i>X-33, GS115, KM71H, CB7435</i>	pPpT4 α S				
	p PIC9				
<i>K. lactis</i>	-----	-----		X	REM
<i>Nicotiana benthamiana</i>	pKB	35S	X	X	-----
<i>Nicotiana benthamiana</i>	pKB	35S	X	X	IMAC (Ni ²⁺ -NTA)
<i>Nicotiana tabacum cv. Xanthi</i>	pCAMBIA	35S	X	X	IMAC e ITC
<i>Nicotiana tabacum cv. Samsun</i>	pCAMBIA1304	35S	X	X	-----

Nota. ECI: Expresión celular intracelular y ECE: Expresión celular extracelular.

Recuperado de (Heidari-Japelaghi et al., 2020; Heidari-Japelaghi et al., 2019; Jiang et al., 2020; Jiang et al., 2019; R. Pandey, Prabhu, et al., 2018; Razaghi et al., 2017; Prabhu et al., 2016; Heidari et al., 2019; Kumar et al., 2018; Krachmarova et al., 2020; R. Pandey, Kumar, et al., 2018; Prabhu, Bharali, et al., 2018; R. Pandey & Veeranki, 2018; Prabhu, Purkayastha, et al., 2018).

Debido a sus múltiples ventajas, incluyendo rápido crecimiento, genética estudiada a fondo, seguridad garantizada y rendimientos elevados los sistemas de expresión bacteriana resultan huéspedes favorables para la producción a gran escala de biofármacos (Du et al., 2019). La producción de rhIFN γ en *B. subtilis* fue de 0.3033 mg/L con la secuencia nativa y de 0.3954 y 0.372 mg/L en dos cepas con codones optimizados sin y con histidina respectivamente (Kumar et al., 2018). Mejorando el índice de adaptación de codones (CAI), el cual indica la frecuencia de uso de un codón predilecto entre genes altamente expresados (Khandia et al., 2019). El CAI aumentó de 0.75 a 0.951 y 0.94 (Kumar et al., 2018). Dado que la expresión de proteínas recombinantes perturba el metabolismo del anfitrión, es importante optimizar el medio de cultivo, suministro de oxígeno, temperatura del cultivo y los parámetros de inducción (Mühlmann et al., 2017). *B. subtilis* mostró una producción de rhIFN γ de 1.3 mg/L al pasar de un medio con carbono de fácil utilización (glucosa) a glicerol, el cual es de metabolización lenta y disminuyendo la temperatura a 28 °C (Kumar et al., 2018).

E. coli sigue siendo el hospedador más común ya que crece rápido en altas densidades celulares, posee una necesidad básica de nutrientes siendo fácil y económico los costos de producción (Soares et al., 2018). Sin embargo, también posee algunas limitaciones incluyendo sesgo de codones, generación de cuerpos de inclusión,

toxicidad, formación de proteínas no funcionales, inestabilidad de ARNm y ausencia de PTM (Jia & Jeon, 2016). No obstante, la ingeniería genética intenta suplir estas limitaciones mediante la eliminación o inserción de genes; de forma particular la delección del gen *pgi* resulta un prospecto interesante ya que se ha visto un incremento en la producción de riboflavina en la cepa K-12 (Lin et al., 2014).

La delección del gen *pgi*, el cual expresa la enzima fosfoglucosa isomerasa, ocasiona el redireccionamiento del flujo de carbono hacia la vía de las pentosas fosfato y promueve la síntesis de nucleótidos (Lin et al., 2014). En la cepa GALG20 (DE3) un mutante de la cepa K-12 (MG1655) con delecciones en *endA* y *recA* para impedir la recombinación y digestión no específica de ADN, además de la delección en *pgi* la producción de rhIFN y fue de 230 mg/L (R. Pandey, Kumar, et al., 2018). Mientras que en la cepa K-12 (MG1655) se produjo 70 mg/L y en BL21 (DE3) alrededor de 155 mg/L de rhIFN y expresados sobre todo como cuerpos de inclusión (R. Pandey, Kumar, et al., 2018).

Para mejorar los rendimientos en la producción de proteínas recombinantes en *E. coli* también se utilizan enfoques como la fusión y coexpresión con proteínas transportadoras, proteína de unión a maltosa (MBP), glutatión-S-transferasa (GST) o chaperonas moleculares (Makino et al., 2011). La coexpresión con etiquetas de polipéptidos similares a la elastina (ELP) contribuye a la agregación de la proteína diana, de manera selectiva y reversible (Rosano & Ceccarelli, 2014). ELP poseen una secuencia de varias repeticiones del complejo pentamérico valina-prolina-glicina-X-prolina (VPGXG), donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina (Bahniuk et al., 2018; Fletcher et al., 2019). RhIFN y expresado en *E. coli* con ELP produjo 1 260

mg/L, por el contrario la producción de rhIFN y sin ELP fue de 128 mg/L (Heidari et al., 2019).

La formación de agregados insolubles debido a etiquetas de histidina en *E. coli* ha generado la investigación de otras formas de purificación (Raran-Kurussi & Waugh, 2017). La maximización de la purificación y disminución de impurezas en cuerpos de inclusión de rhIFN y se logró gracias a la adición de pasos, incluyendo sonicación agregando lisozima, centrifugación en un cama de sacarosa al 20%, centrifugación de alta velocidad al sobrenadante y lavados con un tampón que contenía EDTA y urea no desnaturalizante más sonicación (Krachmarova et al., 2020). Mientras tanto, ELP permite la purificación de rhIFN y mediante una técnica conocida como ciclo de transición inversa (ITC) (Mahmoodi et al., 2019). ITC se basa en la precipitación de la proteína diana fusionada a ELP cuando se alcanza la temperatura de transición o con la fuerza iónica de la solución (Rosano & Ceccarelli, 2014), mediante pasos repetitivos de agregación, centrifugación y resolubilización (Mahmoodi et al., 2019). Heidari y colaboradores (2019), obtuvieron una pureza de rhIFN y de $98 \pm 5\%$ en el tercer ciclo. La fusión del rhIFN y con ELP en *E. coli* fue el mejor sistema de producción bacteriano generando los rendimientos más altos y un porcentaje de pureza casi similar al establecido para la producción de proteínas recombinantes farmacéuticas, es decir, $\geq 99\%$ (Puetz & Wurm, 2019).

La citotoxicidad, viabilidad y proliferación celular se pueden comprobar mediante el ensayo colorimétrico MTT (Riss et al., 2013). Heidari y colaboradores (2019), mediante esta técnica concluyeron en *E. coli* que la bioactividad de rhIFN y coexpresado con ELP en células Vero fue de 3.49×10^7 UI/mL, lo cual se aproxima al valor de rhIFN y comercial con $7,55 \times 10^7$ UI/mL (Zhu et al., 2013). Demostrando que la

coexpresión de ELP junto al gen diana no interfiere con la actividad biológica. Además, ELP ha sido un blanco terapéutico para disminuir la toxicidad y mejorar la eficacia terapéutica (Despanie et al., 2016)

Las levaduras han sido tomadas en cuenta como hospederos para reducir las limitaciones de los sistemas de expresión basados en bacterias (Vieira et al., 2018). Las levaduras conjugan la facilidad de crecimiento rápido en medios simples, al ser un organismo unicelular con la capacidad para realizar modificaciones postraduccionales y la viabilidad de modificaciones genéticas (Thak et al., 2020). *P. pastoris* es una levadura Crabtree negativa, produciendo más biomasa y alcanzando mayores rendimientos de la proteína recombinante (Vieira et al., 2018).

Las restricciones en estas plataformas incluyen sesgo de codones, translocación debido al péptido señal de secreción, errores en el plegamiento y ensamblaje de las proteínas en el sistema retículoendotelial (RES) (Prabhu et al., 2016). Una estrategia muy utilizada para contrarrestar estas limitaciones es la coexpresión de chaperonas o proteínas auxiliares junto a sus co-chaperonas, las cuales se encargan de mantener la proteostasis (Q. Liu et al., 2020). Por lo que están relacionadas con mecanismos de plegado, replegado y la degradación de proteínas en algunos organismos procariontes y eucariotes y su co-expresión ha desempeñado un papel clave en la eficiencia secretora de proteínas recombinantes en levaduras (Vieira et al., 2018). La proteína disulfuro isomerasa (PDI) es una proteína auxiliar encargada de contribuir al plegamiento y secreción de proteínas recombinantes (Rocco et al., 2018). La producción de rhIFN γ pasó de 0.2 mg/L a 0.53 mg/L en el control y mediante la coexpresión con PDI respectivamente (Prabhu et al., 2016). Además Prabhu y colaboradores (2016), verificaron que la optimización de codones aumenta la expresión de la proteína a 1.8

mg/L. RhIFN y expresado en cuatro cepas diferentes de *P. pastoris*, tres vectores y mediante la optimización de codones (GS115-pPIC9-COS1, GS115-pPIC9-COS2, X33-pPICZαA-NS, X33-pPICZαA-COS2, X33-pPpT4αS-COS2, KM71H-pPICZαA-NS, KM71H-pPICZαA-COS2, CB7435-pPICZαA-COS2) (Razaghi, Tan, et al., 2017). Obtuvieron rendimientos menores a 0.5 mg/L, concluyendo que la optimización no está relacionada con el rendimiento y que la producción de rhIFN y en *P. pastoris* no es realista a nivel económico (Razaghi, Tan, et al., 2017).

La producción de rhIFN y coexpresado con varias chaperonas (Kar2p, Ssa1p, Sec63p, Ydj1p, PDI) fue de 1.56 mg/L en la mejor combinación (IFN γ + Kar2p + PDI), aumentando seis veces la expresión de la proteína en comparación con el control que solo expresaba rhIFN γ (Prabhu, Bharali, et al., 2018). Siendo la mejor producción de la proteína de 36.1 mg/L en *P. pastoris* optimizando la secuencia del gen y mediante reactores por lotes (Prabhu, Purkayastha, et al., 2018). RhIFN γ inhibió la proliferación de células de cáncer oral y cáncer de mama humano en un 25 % aproximadamente con 500ng/mL y 100 ng/mL respectivamente (Prabhu, Bharali, et al., 2018; Prabhu, Purkayastha, et al., 2018).

Un paso importante en la obtención de proteínas recombinantes es la purificación la cual debe ser confiable, rápida, rentable y robusta para poder ser aplicada a gran escala (L. Castro et al., 2021). La cromatografía sigue siendo el método más utilizado en la purificación de biofármacos (Hanke & Ottens, 2014); de manera específica la cromatografía por afinidad resulta uno de los métodos más eficientes y con alta selectividad (Mahmoodi et al., 2019). La pureza de rhIFN γ aumentó de 56.5 % a 63.83% y 80% en IFN γ solo, coexpresado con PDI y optimizando codones, mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC) (Prabhu et al., 2016). De

igual formar en la expresión de rhIFN y junto a Kar2p + PDI, la pureza fue del 80% con el método de purificación antes mencionado (Prabhu, Bharali, et al., 2018).

Las estrategias de purificación no cromatográficas pretenden obtener sistemas rentables con altos rendimientos de recuperación y pureza mediante el menor número de pasos, siendo además fáciles de escalar y amigables con el medio ambiente (Jozala et al., 2016). La extracción micelar inversa (REM) involucra la solubilización de biomoléculas en agua de micelas inversas, que son gotas de agua nanométricas contenidas en un límite establecido por el surfactante (L. Castro et al., 2021). Esta técnica consta de dos fases, una extracción hacia adelante donde las proteínas se disuelven de la fase acuosa hacia la fase orgánica y; por otro lado, una extracción posterior en el que la proteína se libera de las micelas inversas hacia una fase acuosa (C. Chen et al., 2019). La pureza de rhIFN y mediante REM de níquel modificado fue del 79.54% utilizando un tensioactivo no iónico (Prabhu, Purkayastha, et al., 2018).

K. lactis al igual que *P. pastoris* es una levadura Crabtree negativa, presenta una densidad celular elevada y utiliza tanto vectores de expresión integradores como episomales (Kim et al., 2015). RhIFN y expresado por primera vez en este hospedero produjo 0.175 mg/L (R. Pandey & Veeranki, 2018). Sin embargo, Pandey & Veeranki mediante la optimización de los parámetros físicos para la expresión de la proteína mediante OVAT (una variable a la vez) lograron obtener 0.39 mg/L de rhIFN γ . Las condiciones más favorables fueron pH 7, 28 °C, 275 rpm de agitación, 60 h de incubación y 18 h para la edad del inóculo (R. Pandey & Veeranki, 2018). La purificación en un solo paso mediante REM con un tensioactivo catiónico en *K. lactis* dió una recuperación del 83% cuando se optimizó la técnica (R. Pandey, Prabhu, et al., 2018). Pandey y colaboradores (2018), concluyeron que los mejores parámetros fueron: pH

igual a 12, 150 mM del tensioactivo bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) y 0.2 M de NaCl en la fase acuosa. Y para la extracción posterior un pH de 7, 0.8 M KCl y 15% de alcohol isopropílico (R. Pandey, Prabhu, et al., 2018).

La levaduras de manera general producen hiperglicosilación; sin embargo, *P. pastoris* y *K. lactis* generan hipermanosilación en menor proporción (Karbalaei et al., 2020). Solo un estudio encontrado en *P. pastoris* analizó la glicosilación para rhIFN γ , en el cual se encontró dos bandas de 17 y 19 kDa (Y. Wang et al., 2019). Según Wang y colaboradores (2019), la banda de 17 kDa se encontraba glicosilada solo en N98; mientras que la banda de 19 kDa presentaba doble glicosilación en N98 y N27. *P. pastoris* sintetiza de 8 a 14 residuos de manosa (Thak et al., 2020). Lo que concuerda con Wang y coautores (2019), en donde la glicofoma más común tenía 11 y 9 residuos de manosa en N26 y N98 respectivamente. De acuerdo con los datos obtenidos en levaduras, *P. pastoris* mediante optimización de codones expresó la mayor cantidad de proteína diana y el porcentaje de purificación no varió mucho independientemente de la técnica o microorganismo.

Por otra parte, los sistemas de expresión basados en plantas son un método frecuente para la producción de proteínas terapéuticas (Yao et al., 2015). Las ventajas de dichas plataformas incluyen rentabilidad, procesamiento de proteína de alta calidad, riesgo casi nulo de contaminación, PTM eucariotas, fácil y económico costo de producción y almacenamiento (Q. Chen & Davis, 2016; Tschofen et al., 2016). Al mismo tiempo, la caracterización de genes adecuados para estos sistemas es cada vez más fácil y directa, con lo cual existe un desarrollo de la genómica, proteómica y bioinformática (Yao et al., 2015).

Jiang y colaboradores (2019), analizaron diferentes variables así como elección del mejor vector viral, truncamiento de la señal N terminal del péptido, optimización de codones, coexpresión de diferentes supresores de silenciamiento viral y reubicación de la proteína en otros compartimentos subcelulares con fusión de péptidos señal. El nivel máximo de producción para rhIFN y en *N. benthamiana* se obtuvo con el vector pKB19mIFN γ ER, un vector basado en el virus del mosaico del bambú (BaMV) (Jiang et al., 2019). La proteína diana coexpresada con el supresor de silenciamiento viral p19, truncando la señal N-terminal (mIFN γ), sin optimización en los codones y la fusión de la señal de retención del RES, alcanzó 119 \pm 0,8 ug/g de peso fresco (Jiang et al., 2019).

En la misma planta se examinó la secreción de rhIFN y junto a cinco señales secretoras (SS) fusionadas al extremo N- terminal de mIFN y para mejorar la solubilidad (Jiang et al., 2020). Los investigadores concluyeron que SS del dominio de la extensina mostró una mejor producción de IFN y tanto en las fracciones intracelulares (IC) como en el líquido de lavado del apoplasto (AWF), de hasta 209 \pm 7 mg/kg y 9.5 \pm 0.45 mg/kg respectivamente. Así mismo, con la agregación de diez unidades de 'Ser-Pro' de la etiqueta HypGP, un péptido hidroxiprolina O-glicosilado que facilita la secreción eficiente de proteínas de fusión aumentando el rendimiento (N. Zhang et al., 2016, 2019), se obtuvo 489 \pm 28 mg/kg de peso fresco en IC y 15.2 \pm 0.98 mg/kg en AWF (Jiang et al., 2020). La biomolécula producida en esta plataforma proporcionó una actividad biológica de 3x10⁷ UI/mg en células HEK 293 T (Jiang et al., 2020).

También se evaluó la fusión de ELP a rhIFN y en *N. tabacum* junto al péptido señal de la extensina de zanahoria (Ext) y γ -zeína de maíz (Zera) con redireccionamiento de la proteína al apoplasto y al RES respectivamente (Heidari-Japelaghi, Valizadeh, Haddad, & Dorani-Uliaie, 2020). Heidari-Japelaghi y

colaboradores (2020), concluyeron que la mejor acumulación de rhIFN y se da en el RES, con hasta 4.05% de TSP y que la fusión con ELP contribuye a la acumulación de la proteína, siendo 3.3 y 4 veces más altos en el péptido señal de la Ext y Zera respectivamente que las proteínas sin ELP. La bioactividad de rhIFN γ -ELP en células Vero fue de 4.82×10^6 UI/mL (Heidari-Japelaghi, Valizadeh, Haddad, & Dorani-Uliaie, 2020), mientras que el valor de rhIFN y comercial es de $7,55 \times 10^7$ UI/mL (Zhu et al., 2013).

La optimización de parámetros como ya se ha mencionado antes es una de las estrategias más utilizadas para mejorar el rendimiento. La acetosiringona (AS) se produce al ocurrir un daño mecánico en el material vegetal contribuyendo con la transcripción de los genes virulentos de *Agrobacterium tumefaciens* (Martínez, 2018). El nivel máximo de expresión del péptido se dio con 200 μ M de AS en *N. tabacum* cv Samsun y con una densidad óptica de 1.0 a 600nm (Heidari-Japelaghi, Valizadeh, Haddad, Dorani-Uliaie, et al., 2020). Los investigadores comprobaron que la expresión de rhIFN y se focalizó en el RES con 19.18 μ g/g de peso de hojas frescas. Según Heidari-Japelaghi y colaboradores (2020), la actividad antiviral en células Vero con rhIFN y confirma una bioactividad de $4,10 \times 10^7$, $4,98 \times 10^6$ y $5,14 \times 10^5$ UI/mg en el extracto crudo de las proteínas en el apoplasto, RES y citoplasma. Evidenciando que la orientación de la biomolécula a los compartimentos subcelulares mejora la acumulación como la actividad biológica (Heidari-Japelaghi, Valizadeh, Haddad, Dorani-Uliaie, et al., 2020).

La glicosilación como una modificación postraduccional capaz de afectar la solubilidad, bioactividad, plegamiento, estabilidad y provocar inmunogenicidad es una característica importante a la hora de producir biofármacos (Goh & Ng, 2018; P. Zhang

et al., 2016). Las plataformas basadas en plantas son capaces de producir N-glicanos parecidos a los de eucariotas, al no ser tan complejos resultan fáciles de manipular para conferir las características deseadas (Schoberer & Strasser, 2018). Las plantas presentan dos glicofomas: en su mayoría GlcNAc₂Man₃GlcNAc₂ (GnGn) con residuos de xilosa y fucosa (GnGnXF), > 60% y estructuras paucimannosídicas, es decir, sin terminales de GlcNAc (MMXF) (Montero-Morales & Steinkellner, 2018).

Jiang y colaboradores (2020), al igual que Heidari-Japelagui y coautores (2020) realizaron análisis de glicosilación mediante el método de tinción PAS (ácido peryódico de Schiff); una técnica que se utiliza para la detección de glicoproteínas, glicolípidos y proteoglicanos (Aryal, 2020; Hodgins, 2017). Se comprobó que IFN γ en ambos estudios estaba N-glicosilado en diferentes proporciones y con tres formas de glicoproteínas (18-20 kDa monoglicosilado, 23-40 kDa con doble glicosilación y 15 kDa sin glicosilar) (Heidari-Japelaghi, Valizadeh, Haddad, & Dorani-Uliaie, 2020; Jiang et al., 2020). Además, después de la digestión con PNGasa A y PNGasa F las proteínas migraron de 20, 36 y 40 kDa a 18, 35 y 36 kDa respectivamente (Heidari-Japelaghi, Valizadeh, Haddad, & Dorani-Uliaie, 2020; Jiang et al., 2020). El primer estudio de perfiles de glicosilación en rhIFN γ en *N. benthamiana* mediante cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC-MS/MS) mostró que el 96% de glicanos en la posición N25 era de tipo complejo con α -(1,3)-fucosa con un predominio de MGnXF y en N97 el 58% de estructuras eran heterogéneas con una predominancia de MGnX (Jiang et al., 2020). Indicando que al igual que en el IFN γ de tipo nativo, la fucosilación se da solo en N25 (Razaghi et al., 2016). A pesar de las similitudes en ambos estudios, sería necesario el análisis de los perfiles de glicosilación en *N. tabacum*. La expresión de rhIFN γ en *N. benthamiana* junto con la señal secretora de extensina y HypGP produjo los rendimientos más altos.

Razaghi y colaboradores (2017) evaluaron la eficacia del rhIFN γ expresado en células CHO y HEK293 en líneas celulares de adenocarcinoma de ovario (PEO1 y SKOV3), determinando que la sensibilidad a rhIFN γ fue mayor en PEO1 con el 70% de muerte celular y el 60% de citostasis. Mientras tanto SKOV3 presentó alrededor del 30% y 20-45% de muerte celular y detención citostática respectivamente. Sin embargo, ningún tratamiento incluido IFN γ -1b presentó diferencias estadísticamente significativas en PEO1. A diferencia de SKOV3 en donde cada molécula diana presentó significancia tanto en muerte celular como en citostasis en el siguiente orden: rhIFN γ expresado en HEK293 = desglucorhIFN γ HEK = rhIFN γ CHO > desglucorhIFN γ CHO \geq hIFN γ 1b (Razaghi, Villacrés, et al., 2017). Siendo este el único estudio en el cual se aborda la eficacia de la proteína diana expresada en otro sistema de expresión diferente a *E. coli*. La línea celular de cáncer de ovario SKOV3 a pesar de la insensibilidad a IFN γ 1b (Wall et al., 2003), demostró susceptibilidad para la proteína expresada en células de mamíferos (Razaghi, Villacrés, et al., 2017). Por otro lado, la eficacia citostática se vio afectada solo por el rhIFN γ y desglucosilado expresado en células CHO y no en HEK293, en tanto que la eficacia citotóxica no se alteró por ninguno de los rhIFNs γ y desglucosilados (Razaghi, Villacrés, et al., 2017). Lo cual involucra la importancia de otros parámetros en la potencia y farmacodinámica de rhIFN γ y como el plegamiento (Vink et al., 2014). Mientras que en PEO1 todos los productos de rhIFN γ tuvieron la misma susceptibilidad independientemente del hospedero y la glicosilación (Razaghi, Villacrés, et al., 2017).

Castro y colaboradores (2021), afirma que la producción de IFNs comerciales de forma general en *E. coli* se debe principalmente a: bajo peso molecular y deficiencia de glicosilaciones extensas en estas moléculas, este microorganismo fue uno de los primeros en utilizar la tecnología del ADN recombinante. Además, *E. coli* posee una amplia gama de herramientas moleculares y las ventajas inherentes como la cinética de

crecimiento rápido con medios de cultivo económicos y simples, hicieron posible una alta expresión de IFNs (L. Castro et al., 2021). Como se apreció en el presente trabajo los rendimientos alcanzados por *E. coli* fueron sobremanera superiores a los expresados por las demás plataformas.

Por otra parte, las afecciones en las que se probó este biofármaco se enumeran a continuación: fibrosis pulmonar idiopática (Kass & Kaminski, 2017; Meyer & Modi, 2016), ataxia de Friedreich (Bürk, 2017; Lynch et al., 2019; Yetkin & Gültekin, 2020), esquizofrenia (Hong & Bang, 2020), fibrosis quística (Eades et al., 2018; Hisert et al., 2020), síndrome de Hiper IgM (Cabral-Marques et al., 2018), dermatitis atópica (Boguniewicz, 2017; D'auria et al., 2016), Parkinson (Panagiotakopoulou et al., 2020), trasplantes (R. Liu et al., 2018), ojo seco (García-Posadas et al., 2016), enfermedades autoinmunes (Longbottom et al., 2016; F. Wang et al., 2018), terapia celular con células estromales mesenquimales (Goedhart et al., 2018; Liang et al., 2018), liquen plano (Shao et al., 2019), enfermedades óseas inmunomediadas (Tang et al., 2018) incluyendo artritis reumatoide (He et al., 2020) e incluso la enfermedad granulomatosa crónica (J. Wu et al., 2017) y osteopetrosis autosómica dominante tipo 2 (ADO2) (Imel et al., 2019).

También estuvieron presentes infecciones abarcando desde enfermedades micobacterianas (Cabral-Marques et al., 2017; Prucha et al., 2020), infecciones parasitarias (Radke et al., 2018), fúngicas (El-Khoury et al., 2017; Furudate et al., 2016; Nami et al., 2019), bacterianas (Langereis et al., 2017) como la tuberculosis (M. Herrera et al., 2018; T. A. Khan et al., 2016) e infecciones virales (Sun et al., 2020) como hepatitis C (Abouelasrar Salama et al., 2020; Ashraf et al., 2019), hepatitis B (J. Chen et al., 2021; Nosaka et al., 2020), virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1)

(Cheng et al., 2019). Las infecciones de virus como el síndrome respiratorio de Oriente Medio (MERS-CoV) (Momattin et al., 2019) y la Covid-19 (Brzoska et al., 2020; Esquivel et al., 2020; Myasnikov et al., 2021; Nile et al., 2020; Noh, 2020; Tembhe et al., 2021) también estuvieron presentes en los artículos encontrados en la revisión sistemática, siendo de gran interés debido a la situación actual por la pandemia.

Algunos tipos de cánceres (Abdolvahab et al., 2020; Bello-Rivero et al., 2018; Pai et al., 2019; Petretto et al., 2016; Rožman & Švajger, 2018) incluyendo de pulmón (Teranishi et al., 2020), colorrectal (F. Castro et al., 2019; Zhao et al., 2020), melanoma (Grasso et al., 2020; Yoon et al., 2017), ovario (Green et al., 2019). IFN γ al ser una molécula inmunoestimuladora y antitumoral resulta una terapia prometedora contra el cáncer (F. Castro et al., 2018). IFN γ fomenta la activación de macrófagos, presentación de antígenos, activación de la respuesta innata, mediar la proliferación celular, apoptosis y controlar la inmunidad antiviral e antibacteriana (Kak et al., 2018).

La limitación del uso clínico de este biofármaco se debe a la dosificación y el medio de administración, ya que entre más simple y fácil, se obtendrá un mejor uso por parte de los pacientes (Razaghi et al., 2016). El incremento de eventos adversos está relacionado con la dosis y la duración del tratamiento (Imel et al., 2019). Siendo los eventos adversos comunes de forma general fatiga, mialgia, síntomas similares a los de la gripe, náuseas, fiebre, reacción en el lugar de la inyección y escalofríos (Bello-Rivero et al., 2018; Esquivel et al., 2020; García-García et al., 2016; Imel et al., 2019; Lynch et al., 2019; Myasnikov et al., 2021; Ozcelik et al., 2020). Todos los eventos adversos mencionados en la presente revisión coinciden con el registro de la ficha técnica de la FDA (FDA, 2015).

Los síntomas similares a los de la gripe están relacionados con la toxicidad intrínseca, en el caso del IFN γ 1b se trata de las endotoxinas producidas por *E.coli* (Cavagnaro, 2013). El principal factor de virulencia es el lipopolisacárido (LPS) aunque los fabricantes garantizan menos de una unidad de endotoxina (EU), es decir, 1 a 100 pg de LPS por 10 a 100 ng/mL de la biomolécula (Schwarz et al., 2014). El LPS en bacterias, los β glucanos en levaduras son reconocidos por TLR4 y CpG-oligodesoxinucleótido por TLR9 (Haile et al., 2015). La expresión de genes afines a la activación de la respuesta inmunitaria innata se aumentó hasta con 0.01 EU, 1 μ g de β glucano y 5 μ g de CpG-oligodesoxinucleótido (Haile et al., 2017). Concluyendo en la importancia al detectar IIRMI en productos terapéuticos para evaluar el riesgo de inmunogenicidad y la calidad de purificación necesaria para controlar los eventos adversos (Haile et al., 2015, 2017).

En otro punto de la producción de esta biomolécula la purificación se basa en cromatografía de columna convencional (FDA, 2015) y los iones metálicos como Ni²⁺ pueden ser lixiviados de la resina generando toxicidad (Hassouneh et al., 2010). A pesar de que los mecanismos moleculares de la acción del Ni²⁺ en el cuerpo humano no están claros, los eventos adversos se relacionan con alergias, enfermedades cardiovasculares y renales (Genchi et al., 2020), al igual que en IFN γ 1b (Lyseng, 2015).

El tiempo de vida media del rhIFN γ varía entre 25 a 35 minutos y 4.5 horas posterior a su aplicación intravenosa o intramuscular respectivamente (Ando et al., 2014). El incremento de la vida media y los efectos secundarios se pueden mejorar mediante la fusión de la proteína diana con anticuerpos específicos que redirigen el biofármaco al sitio específico (Balachandran & Adams, 2013; F. Castro et al., 2018).

Esta metodología se ha aplicado en el tratamiento contra el cáncer y se basa en la fusión del extremo C-terminal del anticuerpo a la región N-terminal del IFN γ (Ebbinghaus et al., 2005). Varios anticuerpos han sido probados incluyendo un fragmento de anticuerpo humano scFv (L19) (Ebbinghaus et al., 2005), TNT 3 (Pasche & Neri, 2012) y anticuerpo 2B8 dirigido a CD20; sin embargo, es necesario la aplicación en ensayos clínicos para corroborar su eficacia (Vasuthasawat et al., 2019).

Capítulo VI: Conclusiones

- *E. coli* es el sistema de expresión más utilizado para la obtención de proteínas recombinantes. Es la mejor plataforma para la producción de rhIFN γ , ya que genera rendimientos y porcentaje de pureza más altos.
- La optimización de codones y parámetros físicos son las estrategias más utilizadas mejorando los resultados de producción en todos los sistemas de expresión de rhIFN γ .
- La actividad biológica no tiene un rol funcional, es independiente de la glicosilación y la coexpresión de rhIFN γ con otras proteínas no altera la bioactividad, aunque la proliferación celular si depende de las líneas células utilizadas y la dosis.
- La toxicidad intrínseca del biofármaco, está en dependencia de las endotoxinas de *E.coli* con síntomas similares a la gripe. Los trastornos cardiovasculares y renales se relacionan con la purificación por cromatografía convencional

Capítulo VII: Recomendaciones

- Promover la investigación y producción de rhIFN y tanto a nivel de laboratorio como a escala industrial en otros sistemas de producción no probados como *Yarrowia lipolytica* y *Hansenula polymorpha*.
- Profundizar más en la relación en los sistemas productivos y la obtención de la molécula para disminuir los efectos secundarios.

Bibliografía

- Abdolvahab, M. H., Darvishi, B., Zarei, M., Majidzadeh-A, K., & Farahmand, L. (2020). Interferons: Role in cancer therapy. *Immunotherapy*, *12*(11), 833–855. <https://doi.org/10.2217/imt-2019-0217>
- Abouelasrar Salama, S., Gouwy, M., De Zutter, A., Pörtner, N., Vanbrabant, L., Berghmans, N., De Buck, M., Struyf, S., & Van Damme, J. (2020). Induction of Chemokines by Hepatitis C Virus Proteins: Synergy of the Core Protein with Interleukin-1 β and Interferon- γ in Liver Bystander Cells. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, *40*(4), 195–206. <https://doi.org/10.1089/jir.2019.0115>
- Adrio, J.-L., & Demain, A. (2010). Recombinant organisms for production of industrial products. *Bioengineered Bugs*, *1*(2), 131. <https://doi.org/10.4161/BBUG.1.2.10484>
- Alspach, E., Lussier, D., & Schreiber, R. (2019). Interferon γ and its important roles in promoting and inhibiting spontaneous and therapeutic cancer immunity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *11*(3). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028480>
- Amann, T., Schmieder, V., Faustrup Kildegaard, H., Borth, N., & Andersen, M. R. (2019). Genetic engineering approaches to improve posttranslational modification of biopharmaceuticals in different production platforms. *Biotechnology and Bioengineering*, *116*(10), 2778–2796. <https://doi.org/10.1002/bit.27101>
- Ando, M., Takahashi, Y., Yamashita, T., Fujimoto, M., Nishikawa, M., Watanabe, Y., & Takakura, Y. (2014). Prevention of adverse events of interferon γ gene therapy

by gene delivery of interferon γ -heparin-binding domain fusion protein in mice.

Molecular Therapy - Methods & Clinical Development, 1, 14023.

<https://doi.org/10.1038/mtm.2014.23>

Arango, G., & Descoteaux, A. (2014). Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. *Frontiers in Immunology*, 5, 491.

<https://doi.org/10.3389/FIMMU.2014.00491>

ARCSA. (2021). *Consulta Datos de Productos: INTERFERON*.

<http://permisosfuncionamiento.controlsanitario.gob.ec/consulta/index.php#>

Aryal, S. (2020, September 22). *Periodic Acid-Schiff (PAS) Staining*.

<https://microbenotes.com/periodic-acid-schiff-pas-staining/>

Ashraf, M. U., Iman, K., Khalid, M. F., Salman, H. M., Shafi, T., Rafi, M., Javaid, N., Hussain, R., Ahmad, F., Shahzad-UI-Hussan, S., Mirza, S., Shafiq, M., Afzal, S., Hamera, S., Anwar, S., Qazi, R., Idrees, M., Qureshi, S. A., & Chaudhary, S. U. (2019). Evolution of efficacious pangenotypic hepatitis C virus therapies.

Medicinal Research Reviews, 39(3), 1091–1136.

<https://doi.org/10.1002/med.21554>

Avau, A., & Matthys, P. (2015). Therapeutic potential of interferon- γ and its antagonists in autoinflammation: Lessons from murine models of systemic juvenile idiopathic arthritis and macrophage activation syndrome. *Pharmaceuticals*, 8(4), 793–815.

<https://doi.org/10.3390/ph8040793>

Bahniuk, M., Alshememry, A., & Unsworth, L. (2018). High-yield recombinant expression and purification of marginally soluble, short elastin-like polypeptides.

BioTechniques, 61(6), 297–304. <https://doi.org/10.2144/000114482>

Balachandran, S., & Adams, G. (2013). Interferon- γ -Induced Necrosis: An Antitumor Biotherapeutic Perspective. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 33(4), 171–180. <https://doi.org/10.1089/jir.2012.0087>

Bandurska, K., Król, I., & Myga-Nowak, M. (2014). Interferony: między strukturą a funkcją. *Postępy Higieny i Medycyny Doswiadczałnej*, 68, 428–440. <https://doi.org/10.5604/17322693.1101229>

Bello-Rivero, I., Garcia-Vega, Y., Duncan-Roberts, Y., Vazquez-Blomquistc, D., Santana-Milian, H., Besada-Perez, V., & Rios-Cabrera, M. (2018). HeberFERON, a new formulation of IFNs with improved pharmacodynamics: Perspective for cancer treatment. *Seminars in Oncology*, 45(1–2), 27–33. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2018.04.007>

Boguniewicz, M. (2017). Biologic Therapy for Atopic Dermatitis: Moving Beyond the Practice Parameter and Guidelines. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 5(6), 1477–1487. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2017.08.031>

Borden, E. (2015). Interferons. In J. Mendelsohn, J. W. Gray, P. M. Howley, M. A. Israel, & C. B. Thompson (Eds.), *The Molecular Basis of Cancer* (4th ed., pp. 739-752.e7). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4066-6.00053-6>

Borden, E., Sen, G., Uze, G., Silverman, R., Ransohoff, R., Foster, G., & Stark, G. (2007). Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(12), 975–990. <https://doi.org/10.1038/nrd2422>

- Brautaset, T., & Valla, S. (2019). Special issue: Recombinant protein expression in microorganisms. In *Microorganisms* (Vol. 7, Issue 9, p. 355). MDPI AG.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms7090355>
- Brzoska, J., Von Eick, H., & Hündgen, M. (2020). Interferons in the Therapy of Severe Coronavirus Infections: A Critical Analysis and Recollection of a Forgotten Therapeutic Regimen with Interferon Beta. *Drug Research*, 70(7), 291–297.
<https://doi.org/10.1055/a-1170-4395>
- Bürk, K. (2017). Friedreich Ataxia: current status and future prospects. *Cerebellum & Ataxias*, 4(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/S40673-017-0062-X>
- Burke, J. D., & Young, H. A. (2019). IFN- γ : A cytokine at the right time, is in the right place. *Seminars in Immunology*, 43, 101280.
<https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.05.002>
- Cabral-Marques, O., França, T. T., Al-Sbiei, A., Schimke, L. F., Khan, T. A., Feriotti, C., da Costa, T. A., Junior, O. R., Weber, C. W., Ferreira, J. F., Tavares, F. S., Valente, C., Di Gesu, R. S. W., Iqbal, A., Riemekasten, G., Amarante-Mendes, G. P., Marzagão Barbuto, J. A., Costa-Carvalho, B. T., Pereira, P. V. S., ... Condino-Neto, A. (2018). CD40 ligand deficiency causes functional defects of peripheral neutrophils that are improved by exogenous IFN- γ . *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 142(5), 1571-1588.e9.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.02.026>
- Cabral-Marques, O., Ramos, R. N., Schimke, L. F., Khan, T. A., Amaral, E. P., Barbosa Bomfim, C. C., Junior, O. R., França, T. T., Arslanian, C., Carola Correia Lima, J. D., Weber, C. W., Ferreira, J. F., Tavares, F. S., Sun, J., D'Imperio Lima, M. R.,

Seelaender, M., Garcia Calich, V. L., Marzagão Barbuto, J. A., Costa-Carvalho, B. T., ... Condino-Neto, A. (2017). Human CD40 ligand deficiency dysregulates the macrophage transcriptome causing functional defects that are improved by exogenous IFN- γ . *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 139(3), 900-912.e7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.07.018>

Carratalá, J. V., Cano-Garrido, O., Sánchez, J., Membrado, C., Pérez, E., Conchillo-Solé, O., Daura, X., Sánchez-Chardi, A., Villaverde, A., Arís, A., Garcia-Fruitós, E., & Ferrer-Miralles, N. (2019). Aggregation-prone peptides modulate interferon gamma functionality in naturally occurring protein nanoparticles. *BioRxiv*, 510636. <https://doi.org/10.1101/510636>

Castro, F., Cardoso, A. P., Gonçalves, R. M., Serre, K., & Oliveira, M. J. (2018). Interferon-gamma at the crossroads of tumor immune surveillance or evasion. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 9, Issue MAY, p. 1). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00847>

Castro, F., Pinto, M. L., Almeida, R., Pereira, F., Silva, A. M., Pereira, C. L., Santos, S. G., Barbosa, M. A., Gonçalves, R. M., & Oliveira, M. J. (2019). Chitosan/poly(γ -glutamic acid) nanoparticles incorporating IFN- γ for immune response modulation in the context of colorectal cancer. *Biomaterials Science*, 7(8), 3386–3403. <https://doi.org/10.1039/c9bm00393b>

Castro, L., Lobo, G., Pereira, P., Freire, M., Neves, M., & Pedro, A. (2021). Interferon-based biopharmaceuticals: Overview on the production, purification, and formulation. *Vaccines*, 9(4), 328. <https://doi.org/10.3390/vaccines9040328>

Cavagnaro, J. A. (2013). *Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals: a science-*

based approach to facilitating clinical trials. John Wiley & Sons.

<http://library.nuft.edu.ua/ebook/file/Cavcaltioharma8.pdf>

Chen, C., Tian, H., Xing, S., Li, C., Zeng, X., & He, L. (2019). Influence of different parameters on reverse micelle extraction combined with acetone precipitation to purify sn-1,3 extracellular lipase from *Aspergillus niger* GZUF36. *Journal of Food Science and Technology*, *56*(6), 2899–2908. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03743-4>

Chen, J., Li, Y., Lai, F., Wang, Y., Sutter, K., Dittmer, U., Ye, J., Zai, W., Liu, M., Shen, F., Wu, M., Hu, K., Li, B., Lu, M., Zhang, X., Zhang, J., Li, J., Chen, Q., & Yuan, Z. (2021). Functional Comparison of Interferon- α Subtypes Reveals Potent Hepatitis B Virus Suppression by a Concerted Action of Interferon- α and Interferon- γ Signaling. *Hepatology*, *73*(2), 486–502. <https://doi.org/10.1002/hep.31282>

Chen, Q., & Davis, K. (2016). The potential of plants as a system for the development and production of human biologics [version 1; referees: 3 approved]. *F1000Research*, *5*. <https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.8010.1>

Cheng, L., Tang, X., Xu, L., Zhang, L., Shi, H., Peng, Q., Zhao, F., Zhou, Y., He, Y., Wang, H., Zhou, B., Gao, Z., & Chen, Z. (2019). Interferon- γ upregulates $\Delta 42$ PD1 expression on human monocytes via the PI3K/AKT pathway. *Immunobiology*, *224*(3), 388–396. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2019.02.009>

Curtsinger, J. M., Agarwal, P., Lins, D. C., & Mescher, M. F. (2012). Autocrine IFN- γ Promotes Naive CD8 T Cell Differentiation and Synergizes with IFN- α To Stimulate Strong Function. *The Journal of Immunology*, *189*(2), 659–668.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102727>

D'auria, E., Banderali, G., Barberi, S., Gualandri, L., Pietra, B., Riva, E., & Cerri, A.

(2016). Atopic dermatitis: Recent insight on pathogenesis and novel therapeutic target. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, *34*(2), 98–108.

<https://doi.org/10.12932/AP0732.34.2.2016>

De Weerd, N. A., & Nguyen, T. (2012). The interferons and their receptors-distribution and regulation. *Immunology and Cell Biology*, *90*(5), 483–491.

<https://doi.org/10.1038/icb.2012.9>

Despanie, J., Dhandhukia, J. P., Hamm-Alvarez, S. F., & MacKay, J. A. (2016). Elastin-Like Polypeptides: Therapeutic Applications for an Emerging Class of Nanomedicines. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, *240*, 108. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2015.11.010>

Donnelly, R. P., & Kotenko, S. V. (2010). Interferon-Lambda: A New Addition to an Old Family. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, *30*(8), 564.

<https://doi.org/10.1089/JIR.2010.0078>

Du, T., Buenbrazo, N., Kell, L., Rahmani, S., Sim, L., Withers, S. G., DeFrees, S., & Wakarchuk, W. (2019). A Bacterial Expression Platform for Production of Therapeutic Proteins Containing Human-like O-Linked Glycans. *Cell Chemical Biology*, *26*(2), 203-212.e5. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMBIOL.2018.10.017>

Eades, C. P., Armstrong-James, D. P. H., Periselneris, J., Jones, A., Simmonds, N., Kelleher, P., & Shah, A. (2018). Improvement in *Exophiala dermatitidis* airway persistence and respiratory decline in response to interferon-gamma therapy in a

patient with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 17(3), e32–e34.

<https://doi.org/10.1016/j.jcf.2018.02.002>

Ebbinghaus, C., Ronca, R., Kaspar, M., Grabulovski, D., Berndt, A., Kosmehl, H., Zardi, L., & Neri, D. (2005). Engineered vascular-targeting antibody-interferon- γ fusion protein for cancer therapy. *International Journal of Cancer*, 116(2), 304–313.

<https://doi.org/10.1002/ijc.20952>

El-Khoury, M., Ligot, R., Mahoney, S., Stack, C. M., Perrone, G. G., & Morton, C. O. (2017). The in vitro effects of interferon-gamma, alone or in combination with amphotericin B, tested against the pathogenic fungi *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *BMC Research Notes*, 10, 364.

<https://doi.org/10.1186/s13104-017-2696-4>

Esquivel, I., Pérez, J., Duncan, Y., Vazquez, D., Bequet, M., Baez, L., Castro, J., Cobas, L., Pagé, E., Travieso, S., Martinez, C., Campa, I., Fernandez, J., Camacho, H., Díaz, M., Sin, A., García, M., Martínez, S., Alonso, M., ... Bello, I. (2020). Effect and safety of combination of interferon alpha-2b and gamma or interferon alpha-2b for negativization of SARS-CoV-2 viral RNA. Preliminary results of a randomized controlled clinical trial. *MedRxiv*.

<https://doi.org/10.1101/2020.07.29.20164251>

FDA. (2015). *HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION*.

www.fda.gov/medwatch.

FDA. (2018). *Biological Product Definitions*.

<https://www.fda.gov/files/drugs/published/Biological-Product-Definitions.pdf>

- Feng, J., Wickenhagen, A., Turnbull, M. L., Rezelj, V. V., Kreher, F., Tilston-Lunel, N. L., Slack, G. S., Brennan, B., Koudriakova, E., Shaw, A. E., Rihn, S. J., Rice, C. M., Bieniasz, P. D., Elliott, R. M., Shi, X., & Wilson, S. J. (2018). Interferon-Stimulated Gene (ISG)-Expression Screening Reveals the Specific Antibunyaviral Activity of ISG20. *Journal of Virology*, *92*(13), 2140–2157. <https://doi.org/10.1128/JVI.02140-17>
- Feroze, K., & Wang, J. (2018). Interferon Induced Retinopathy. In *StatPearls*. StatPearls . <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28722892>
- Ferreira, V., Borba, H., Bonetti, A., Leonart, L., & Pontarolo, R. (2019). Cytokines and Interferons: Types and Functions. In *Autoantibodies and Cytokines*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.74550>
- Ferrer-Miralles, N., Saccardo, P., Corchero, J., Xu, Z., & García-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
- Fletcher, E., Yan, D., Kosiba, A., Zhou, Y., & Shi, H. (2019). Biotechnological applications of elastin-like polypeptides and the inverse transition cycle in the pharmaceutical industry. *Protein Expression and Purification*, *153*, 114–120. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.09.006>
- Furudate, S., Fujimura, T., Kakizaki, A., Hidaka, T., Asano, M., & Aiba, S. (2016). Tumor-associated M2 macrophages in mycosis fungoides acquire immunomodulatory function by interferon alpha and interferon gamma. *Journal of Dermatological Science*, *83*(3), 182–189.

<https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2016.05.004>

García-García, I., Hernández-González, I., Díaz-Machado, A., González-Delgado, C. A., Pérez-Rodríguez, S., García-Vega, Y., Campos-Mojena, R., Tuero-Iglesias, Á. D., Valenzuela-Silva, C. M., Cruz-Ramírez, A., Martín-Trujillo, A., Santana-Milián, H., López-Saura, P. A., & Bello-Rivero, I. (2016). Pharmacokinetic and pharmacodynamic characterization of a novel formulation containing co-formulated interferons alpha-2b and gamma in healthy male volunteers. *BMC Pharmacology and Toxicology*, *17*(1), 58. <https://doi.org/10.1186/s40360-016-0103-8>

García-Posadas, L., Hodges, R. R., Li, D., Shatos, M. A., Storr-Paulsen, T., Diebold, Y., & Dartt, D. A. (2016). Interaction of IFN- γ with cholinergic agonists to modulate rat and human goblet cell function. *Mucosal Immunology*, *9*(1), 206–217. <https://doi.org/10.1038/mi.2015.53>

García, A. (2017). Ten Strategies of Interferon Evasion by Viruses. *Cell Host and Microbe*, *22*(2), 176–184. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.07.012>

Genchi, G., Carocci, A., Lauria, G., Sinicropi, M. S., & Catalano, A. (2020). Nickel: Human Health and Environmental Toxicology. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *17*(3), 679. <https://doi.org/10.3390/IJERPH17030679>

Goedhart, M., Cornelissen, A. S., Kuijk, C., Geerman, S., Kleijer, M., Van Buul, J. D., Huveneers, S., Raaijmakers, M. H. G. ., Young, H. A., Wolkers, M. C., Voermans, C., & Nolte, M. A. (2018). Interferon-gamma impairs maintenance and alters hematopoietic support of bone marrow mesenchymal stromal cells. *Stem*

Cells and Development, 27(9), 579–589. <https://doi.org/10.1089/scd.2017.0196>

Goh, J. B., & Ng, S. K. (2018). Impact of host cell line choice on glycan profile. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(6), 851–867.
<https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1416577>

Goldszmid, R. S., Caspar, P., Rivollier, A., White, S., Dzutsev, A., Hieny, S., Kelsall, B., Trinchieri, G., & Sher, A. (2012). NK Cell-Derived Interferon- γ Orchestrates Cellular Dynamics and the Differentiation of Monocytes into Dendritic Cells at the Site of Infection. *Immunity*, 36(6), 1047–1059.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.026>

Graber, J., & Dhib-Jalbut, S. (2014). Interferons. *Encyclopedia of the Neurological Sciences*, 718–723. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385157-4.00182-2>

Grasso, C. S., Tsoi, J., Onyshchenko, M., Abril-Rodriguez, G., Ross-Macdonald, P., Wind-Rotolo, M., Champhekar, A., Medina, E., Torrejon, D. Y., Shin, D. S., Tran, P., Kim, Y. J., Puig-Saus, C., Campbell, K., Vega-Crespo, A., Quist, M., Martignier, C., Luke, J. J., Wolchok, J. D., ... Ribas, A. (2020). Conserved Interferon- γ Signaling Drives Clinical Response to Immune Checkpoint Blockade Therapy in Melanoma. *Cancer Cell*, 38(4), 500-515.e3.
<https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.08.005>

Green, D. S., Husain, S. R., Johnson, C. L., Sato, Y., Han, J., Joshi, B., Hewitt, S. M., Puri, R. K., & Zoon, K. C. (2019). Combination immunotherapy with IL-4 Pseudomonas exotoxin and IFN- α and IFN- γ mediate antitumor effects in vitro and in a mouse model of human ovarian cancer. *Immunotherapy*, 11(6), 483–496. <https://doi.org/10.2217/imt-2018-0158>

- Gupta, V., Sengupta, M., Prakash, J., & Tripathy, B. C. (2016). Production of Recombinant Pharmaceutical Proteins. In *Basic and Applied Aspects of Biotechnology* (pp. 77–101). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-0875-7_4
- Haabeth, O. A. W., Lorvik, K. B., Hammarström, C., Donaldson, I. M., Haraldsen, G., Bogen, B., & Corthay, A. (2011). Inflammation driven by tumour-specific Th1 cells protects against B-cell cancer. *Nature Communications*, 2, 240. <https://doi.org/10.1038/ncomms1239>
- Haile, L., Puig, M., Kelley-Baker, L., & Verthelyi, D. (2015). Detection of Innate Immune Response Modulating Impurities in Therapeutic Proteins. *PLOS ONE*, 10(4), e0125078. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125078>
- Haile, L., Puig, M., Polumuri, S., Ascher, J., & Verthelyi, D. (2017). In Vivo Effect of Innate Immune Response Modulating Impurities on the Skin Milieu Using a Macaque Model: Impact on Product Immunogenicity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106(3), 751–760. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2016.11.001>
- Hanke, A., & Ottens, M. (2014). Purifying biopharmaceuticals: knowledge-based chromatographic process development. *Trends in Biotechnology*, 32(4), 210–220. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2014.02.001>
- Harris, R., & Kilby, P. (2014). Amino acid misincorporation in recombinant biopharmaceutical products. *Current Opinion in Biotechnology*, 30, 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.05.003>
- Hassouneh, W., Christensen, T., & Chilkoti, A. (2010). Elastin-Like Polypeptides as a

Purification Tag for Recombinant Proteins. *Current Protocols in Protein Science*, 6. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0611s61>

He, X., Yang, Y., Yao, M., Yang, L., Ao, L., Hu, X., Li, Z., Wu, X., Tan, Y., Xing, W., Guo, W., Bellanti, J. A., Zheng, S. G., & Xu, X. (2020). Combination of human umbilical cord mesenchymal stem (stromal) cell transplantation with IFN- γ treatment synergistically improves the clinical outcomes of patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 79(10), 1298–1304. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2020-217798>

Heidari-Japelaghi, R., Valizadeh, M., Haddad, R., & Dorani-Uliaie, E. (2020). Fusion to elastin-like polypeptide increases production of bioactive human IFN- γ in tobacco. *Transgenic Research*, 29(4), 381–394. <https://doi.org/10.1007/s11248-020-00205-y>

Heidari-Japelaghi, R., Valizadeh, M., Haddad, R., Dorani-Uliaie, E., & Jalali-Javaran, M. (2020). Production of bioactive human IFN- γ protein by agroinfiltration in tobacco. *Protein Expression and Purification*, 173, 105616. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105616>

Heidari, R., Haddad, R., Valizadeh, M., Dorani, E., & Jalali, M. (2019). Elastin-like polypeptide fusions for high-level expression and purification of human IFN- γ in *Escherichia coli*. *Analytical Biochemistry*, 585(July), 113401. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.113401>

Hermant, P., & Michiels, T. (2014). Interferon- λ in the Context of Viral Infections: Production, Response and Therapeutic Implications. *Journal of Innate Immunity*, 6(5), 563–574. <https://doi.org/10.1159/000360084>

- Herrera, M., González, Y., & Juárez, E. (2018). El IFN- γ induce LL-37 pero no controla el crecimiento de M. tuberculosis en macrófagos alveolares. *Neumología y Cirugía de Tórax*, 77(4), 267–275.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0028-37462018000400267
- Herrera, S. C., & Bach, E. A. (2019). JAK/STAT signaling in stem cells and regeneration: from Drosophila to vertebrates. *Development (Cambridge, England)*, 146(2), dev167643. <https://doi.org/10.1242/DEV.167643>
- Hisert, K. B., Birkland, T. P., Schoenfelt, K. Q., Long, M. E., Grogan, B., Carter, S., Liles, W. C., McKone, E. F., Becker, L., & Manicone, A. M. (2020). Ivacaftor decreases monocyte sensitivity to interferon- γ in people with cystic fibrosis. *ERJ Open Research*, 6(2), 00318–02019. <https://doi.org/10.1183/23120541.00318-2019>
- Hodgin, J. (2017). *PROTOCOL FOR PERIODIC ACID SCHIFF (PAS) STAINING GLOMERULAR MESANGIAL MATRIX QUANTIFICATION*.
[https://www.mmpc.org/shared/document.aspx?id=312&docType=Protocol#:~:text=Summary%3APeriodic acid-Schiff \(,diagnose glomerular mesangial matrix expansion.](https://www.mmpc.org/shared/document.aspx?id=312&docType=Protocol#:~:text=Summary%3APeriodic%20acid-Schiff%20(,diagnose%20glomerular%20mesangial%20matrix%20expansion.)
- Hong, J., & Bang, M. (2020). Anti-inflammatory Strategies for Schizophrenia: A Review of Evidence for Therapeutic Applications and Drug Repurposing. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, 18(1), 24.
<https://doi.org/10.9758/CPN.2020.18.1.10>
- Horizon Pharma Ireland Ltd. (2016). *Long-Term Safety Extension Study of ACTIMMUNE® (interferon γ -1b) in Children and Young Adults with Friedreich's Ataxia* .

- Imel, E. A., Liu, Z., Acton, D., Coffman, M., Gebregziabher, N., Tong, Y., & Econs, M. J. (2019). Interferon Gamma-1b Does Not Increase Markers of Bone Resorption in Autosomal Dominant Osteopetrosis. *Journal of Bone and Mineral Research*, *34*(8), 1436–1445. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3715>
- Isaacs, A., & Lindenmann, J. (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>
- Ivashkiv, L. B. (2018). IFN γ : signalling, epigenetics and roles in immunity, metabolism, disease and cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*, *18*(9), 545–558. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0029-z>
- Jia, B., & Jeon, C. O. (2016). High-throughput recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Current status and future perspectives. *Open Biology*, *6*(8). <https://doi.org/10.1098/rsob.160196>
- Jiang, M. C., Hu, C. C., Hsu, W. L., Hsu, T. L., Lin, N. S., & Hsu, Y. H. (2020). Fusion of a Novel Native Signal Peptide Enhanced the Secretion and Solubility of Bioactive Human Interferon Gamma Glycoproteins in *Nicotiana benthamiana* Using the Bamboo Mosaic Virus-Based Expression System. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 594758. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.594758>
- Jiang, M. C., Hu, C. C., Lin, N. S., & Hsu, Y. H. (2019). Production of human IFN γ protein in *nicotiana benthamiana* plant through an enhanced expression system based on bamboo mosaic virus. *Viruses*, *11*(6). <https://doi.org/10.3390/v11060509>

- Jorgovanovic, D., Song, M., Wang, L., & Zhang, Y. (2020). Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: A review. In *Biomarker Research* (Vol. 8, Issue 1, pp. 1–16). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s40364-020-00228-x>
- Jozala, A. F., Geraldles, D. C., Tundisi, L. L., Feitosa, V. de A., Breyer, C. A., Cardoso, S. L., Mazzola, P. G., de Oliveira-Nascimento, L., Rangel-Yagui, C. de O., Magalhães, P. de O., de Oliveira, M. A., & Pessoa, A. (2016). Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification. *Brazilian Journal of Microbiology*, *47*, 51–63. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.007>
- Kak, G., Raza, M., & Tiwari, B. K. (2018). Interferon-gamma (IFN- γ): Exploring its implications in infectious diseases. In *Biomolecular Concepts* (Vol. 9, Issue 1, pp. 64–79). Walter de Gruyter GmbH. <https://doi.org/10.1515/bmc-2018-0007>
- Kamionka, M. (2011). Engineering of Therapeutic Proteins Production in *Escherichia coli*. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *12*(2), 268–274. <https://doi.org/10.2174/138920111794295693>
- Karbalaei, M., Rezaee, S. A., & Farsiani, H. (2020). *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 235, Issue 9, pp. 5867–5881). Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/jcp.29583>
- Kass, D. J., & Kaminski, N. (2017). Time to share: Lessons from post hoc analyses of IPF trials. *Thorax*, *72*(2), 101–102. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2016-209293>
- Katsuyama, T., & Moulton, V. (2021). Cytokines. In *Systemic Lupus Erythematosus* (pp.

151–157). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814551-7.00019-2>

Khan, S., Ullah, M. W., Siddique, R., Nabi, G., Manan, S., Yousaf, M., & Hou, H. (2016).

Role of recombinant DNA technology to improve life. *International Journal of Genomics*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2405954>

Khan, T. A., Mazhar, H., Saleha, S., Tipu, H., Muhammad, N., & Abbas, M. (2016).

Interferon-Gamma Improves Macrophages Function against M. tuberculosis in Multidrug-Resistant Tuberculosis Patients. *Chemotherapy Research and Practice*, 2016, 7295390. <https://doi.org/10.1155/2016/7295390>

Khandia, R., Singhal, S., Kumar, U., Ansari, A., Tiwari, R., Dhama, K., Das, J., Munjal, A., & Singh, R. K. (2019). Analysis of Nipah Virus Codon Usage and Adaptation

to Hosts. *Frontiers in Microbiology*, 10, 886.

<https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00886>

Khanna, N. R., & Gerriets, V. (2020). *Interferon*.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555932/>

Kim, H., Yoo, S. J., & Kang, H. (2015). Yeast synthetic biology for the production of recombinant therapeutic proteins. *FEMS Yeast Research*, 15(1), 1–16.

<https://doi.org/10.1111/1567-1364.12195>

Kline, J., & Kitagaki, K. (2006). INTERFERONS. *Encyclopedia of Respiratory Medicine*,

346–350. <https://doi.org/10.1016/B0-12-370879-6/00190-3>

Kotenko, S., Rivera, A., Parker, D., & Durbin, J. E. (2019). Type III IFNs: Beyond antiviral protection. *Seminars in Immunology*, 43, 101303.

<https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.101303>

- Krachmarova, E., Ivanov, I., & Nacheva, G. (2020). Nucleic acids in inclusion bodies obtained from *E. coli* cells expressing human interferon-gamma. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 139. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01400-6>
- Krachmarova, E., Tileva, M., Lilkova, E., Petkov, P., Maskos, K., Ilieva, N., Ivanov, I., Litov, L., & Nacheva, G. (2017). His-FLAG tag as a fusion partner of glycosylated human interferon-gamma and its mutant: Gain or loss? *BioMed Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/3018608>
- Kumar, N., Pandey, R., Prabhu, A. A., & Venkata Dasu, V. (2018). Genetic and substrate-level modulation of *Bacillus subtilis* physiology for enhanced extracellular human interferon gamma production. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 48(5), 391–401. <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1446157>
- Langereis, J. D., Pickkers, P., de Kleijn, S., Gerretsen, J., de Jonge, M. I., & Kox, M. (2017). Spleen-derived IFN- γ induces generation of PD-L1 + -suppressive neutrophils during endotoxemia. *Journal of Leukocyte Biology*, 102(6), 1401–1409. <https://doi.org/10.1189/jlb.3a0217-051rr>
- Lavigne, G. M., Russell, H., Sherry, B., & Ke, R. (2020). Autocrine and paracrine interferon signaling as ‘ring vaccination’ and ‘contact tracing’ strategies to suppress virus infection in a host. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2020.12.09.20246777. <https://doi.org/10.1101/2020.12.09.20246777>
- Lee, A., & Ashkar, A. (2018). The Dual Nature of Type I and Type II Interferons. *Frontiers in Immunology*, 9, 2061. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.02061>
- Liang, C., Jiang, E., Yao, J., Wang, M., Chen, S., Zhou, Z., Zhai, W., Ma, Q., Feng, S., &

- Han, M. (2018). Interferon- γ mediates the immunosuppression of bone marrow mesenchymal stem cells on T-lymphocytes in vitro. *Hematology*, 23(1), 44–49. <https://doi.org/10.1080/10245332.2017.1333245>
- Lilkova, E., Petkov, P., Ilieva, N., Krachmarova, E., Nacheva, G., & Litov, L. (2019). Molecular modeling of the effects of glycosylation on the structure and dynamics of human interferon-gamma. *Journal of Molecular Modeling*, 25(5). <https://doi.org/10.1007/s00894-019-4013-8>
- Lin, Z., Xu, Z., Li, Y., Wang, Z., Chen, T., & Zhao, X. (2014). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of riboflavin. *Microbial Cell Factories* 2014 13:1, 13(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S12934-014-0104-5>
- Liu, Q., Liang, C., & Zhou, L. (2020). Structural and functional analysis of the Hsp70/Hsp40 chaperone system. *Protein Science*, 29(2), 378–390. <https://doi.org/10.1002/pro.3725>
- Liu, R., Merola, J., Manes, T. D., Qin, L., Tietjen, G. T., López-Giráldez, F., Broecker, V., Fang, C., Xie, C., Chen, P. M., Kirkiles-Smith, N. C., Jane-Wit, D., & Pober, J. S. (2018). Interferon- γ converts human microvascular pericytes into negative regulators of alloimmunity through induction of indoleamine 2,3-dioxygenase 1. *JCI Insight*, 3(5), e97881. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.97881>
- Longbottom, E. R., Torrance, H. D. T., Owen, H. C., Fragkou, P. C., Hinds, C. J., Pearse, R. M., & O'Dwyer, M. J. (2016). Features of Postoperative Immune Suppression Are Reversible with Interferon Gamma and Independent of Interleukin-6 Pathways. *Annals of Surgery*, 264(2), 370–377. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000001484>

- Lozhkov, A., Klotchenko, S., Ramsay, E., Moshkoff, H., Moshkoff, D., Vasin, A., & Salvato, M. (2020). The Key Roles of Interferon Lambda in Human Molecular Defense against Respiratory Viral Infections. *Pathogens*, *9*(12), 1–25. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS9120989>
- Lynch, D. R., Hauser, L., McCormick, A., Wells, M., Dong, Y. N., McCormack, S., Schadt, K., Perlman, S., Subramony, S. H., Mathews, K. D., Brocht, A., Ball, J., Perdok, R., Grahn, A., Vescio, T., Sherman, J. W., & Farmer, J. M. (2019). Randomized, double-blind, placebo-controlled study of interferon- γ 1b in Friedreich Ataxia. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, *6*(3), 546–553. <https://doi.org/10.1002/acn3.731>
- Lyseng, K. (2015). Interferon γ -1b in chronic granulomatous disease and severe malignant osteopetrosis: a guide to its use in the USA. *Drugs and Therapy Perspectives*, *31*(7), 213–220. <https://doi.org/10.1007/s40267-015-0222-0>
- Ma, Y., Lee, C. J., & Park, J. S. (2020). Strategies for optimizing the production of proteins and peptides with multiple disulfide bonds. *Antibiotics*, *9*(9), 1–26. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9090541>
- Mahmoodi, S., Pourhassan-Moghaddam, M., Wood, D. W., Majdi, H., & Zarghami, N. (2019). Current affinity approaches for purification of recombinant proteins. *Cogent Biology*, *5*(1). <https://doi.org/10.1080/23312025.2019.1665406>
- Makino, T., Skretas, G., & Georgiou, G. (2011). Strain engineering for improved expression of recombinant proteins in bacteria. *Microbial Cell Factories* *2011* *10*:1, *10*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-32>

- Martínez, K. (2018). *Optimización de un protocolo de transformación genética mediada por Agrobacterium tumefaciens en Pentalinon andrieuxii* [INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ].
<http://repositoriodigital.tuxtla.tecnm.mx/xmlui/bitstream/handle/123456789/1627/MDTTQH448.4M37.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Menzella, H. (2011). Comparison of two codon optimization strategies to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 10(15), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-15>
- Meyer, K., & Modi, D. (2016). New Treatments for Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Clinical Pulmonary Medicine*, 23(6), 241–251.
<https://doi.org/10.1097/CPM.0000000000000166>
- Miller, C. H. T., Maher, S. G., & Young, H. A. (2009). Clinical use of interferon- γ . *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1182, 69–79.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05069.x>
- Mockus, L., Peterson, J., Lainez, J. M., & Reklaitis, G. (2015). Batch-to-Batch Variation: A Key Component for Modeling Chemical Manufacturing Processes. *Organic Process Research & Development*, 19(8), 908–914.
<https://doi.org/10.1021/op500244f>
- Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., & Altman, D. G. (2009). Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. *BMJ*, 339.
<https://doi.org/10.1136/bmj.b2535>
- Mojic, M., Takeda, K., & Hayakawa, Y. (2017). The dark side of IFN- γ : Its role in

promoting cancer immunoevasion. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 89. <https://doi.org/10.3390/ijms19010089>

Momattin, H., Al-Ali, A. Y., & Al-Tawfiq, J. A. (2019). A Systematic Review of therapeutic agents for the treatment of the Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV). *Travel Medicine and Infectious Disease*, 30, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2019.06.012>

Montero-Morales, L., & Steinkellner, H. (2018). Advanced Plant-Based Glycan Engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6, 81. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00081>

Moss, R. B., Mayer-Hamblett, N., Wagener, J., Daines, C., Hale, K., Ahrens, R., Gibson, R. L., Anderson, P., Retsch-Bogart, G., Nasr, S. Z., Noth, I., Waltz, D., Zeitlin, P., Ramsey, B., & Starko, K. (2005). Randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalating study of aerosolized interferon gamma-1b in patients with mild to moderate cystic fibrosis lung disease. *Pediatric Pulmonology*, 39(3), 209–218. <https://doi.org/10.1002/ppul.20152>

Mueller, P., Gauttam, R., Raab, N., Handrick, R., Wahl, C., Leptihn, S., Zorn, M., Kussmaul, M., Scheffold, M., Eikmanns, B., Elling, L., & Gaisser, S. (2018). High level in vivo mucin-type glycosylation in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 168. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-1013-9>

Mühlmann, M., Forsten, E., Noack, S., & Büchs, J. (2017). Optimizing recombinant protein expression via automated induction profiling in microtiter plates at different temperatures. *Microbial Cell Factories*, 16, 1–12. <https://doi.org/10.1186/S12934-017-0832-4>

- Muir, A., Sylvestre, P., & Rockey, D. (2006). Interferon gamma-1b for the treatment of fibrosis in chronic hepatitis C infection. *Journal of Viral Hepatitis*, *13*(5), 322–328. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2005.00689.x>
- Myasnikov, A. L. Z., Berns, S. A., Talyzin, P. A., & Ershov, F. I. (2021). Interferon gamma in the treatment of patients with moderate COVID-19. *Voprosy Virusologii*, *66*(1), 47–54. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-24>
- Nambisan, P. (2017). Recombinant DNA Technology and Genetically Modified Organisms. In *An Introduction to Ethical, Safety and Intellectual Property Rights Issues in Biotechnology* (pp. 83–126). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809231-6.00004-1>
- Nami, S., Aghebati-Maleki, A., Morovati, H., & Aghebati-Maleki, L. (2019). Current antifungal drugs and immunotherapeutic approaches as promising strategies to treatment of fungal diseases. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *110*, 857–868. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.12.009>
- 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>
- Nile, S. H., Nile, A., Qiu, J., Li, L., Jia, X., & Kai, G. (2020). COVID-19: Pathogenesis, cytokine storm and therapeutic potential of interferons. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, *53*, 66–70. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2020.05.002>
- Noh, G. (2020). Ifn-Gamma As a Major Antiviral Therapeutic for Viral Epidemics, Including Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): A

Clinically Forgotten But Potential Antiviral Cytokine and Non-Virus-Specific Antiviral As a New Antiviral Strategy. *Journal of Clinical Review & Case Reports*, 5(4), 1–5. <https://ssrn.com/abstract=3588077>

Nosaka, T., Naito, T., Matsuda, H., Ohtani, M., Hiramatsu, K., Nemoto, T., Nishizawa, T., Okamoto, H., & Nakamoto, Y. (2020). Molecular signature of hepatitis B virus regulation by interferon- γ in primary human hepatocytes. *Hepatology Research*, 50(3), 292–302. <https://doi.org/10.1111/hepr.13450>

Owczarek, B., Gerszberg, A., & Hnatuszko, K. (2019). A Brief Reminder of Systems of Production and Chromatography-Based Recovery of Recombinant Protein Biopharmaceuticals. In *BioMed Research International* (Vol. 2019). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2019/4216060>

Ozcelik, F., Tanoglu, A., Çıracı, M. Z., & Ozcelik, I. K. (2020). Use of Immune Modulator Interferon-Gamma to Support Combating COVID-19 Pandemic. *International Journal of Coronaviruses*, 1(1), 1–15. <https://doi.org/10.14302/issn.2692-1537.ijcv-20-3345>

Pai, C. C. S., Huang, J. T., Lu, X., Simons, D. M., Park, C., Chang, A., Tamaki, W., Liu, E., Roybal, K. T., Seagal, J., Chen, M., Hagihara, K., Wei, X. X., DuPage, M., Kwek, S. S., Oh, D. Y., Daud, A., Tsai, K. K., Wu, C., ... Fong, L. (2019). Clonal Deletion of Tumor-Specific T Cells by Interferon- γ Confers Therapeutic Resistance to Combination Immune Checkpoint Blockade. *Immunity*, 50(2), 477–492.e8. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.01.006>

Panagiotakopoulou, V., Ivanyuk, D., Cicco, S. De, Haq, W., Arsić, A., Yu, C., Messelodi, D., Oldrati, M., Schöndorf, D. C., Perez, M.-J., Cassatella, R. P., Jakobi, M.,

- Schneiderhan-Marra, N., Gasser, T., Nikić-Spiegel, I., & Deleidi, M. (2020). Interferon- γ signaling synergizes with LRRK2 in neurons and microglia derived from human induced pluripotent stem cells. *Nature Communications*, 11(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18755-4>
- Pandey, R., Kumar, N., Monteiro, G. A., Veeranki, V. D., & Prazeres, D. M. . (2018). Re-engineering of an Escherichia coli K-12 strain for the efficient production of recombinant human Interferon Gamma. *Enzyme and Microbial Technology*, 117, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.06.001>
- Pandey, R., Prabhu, A., & Veeranki, V. (2018). Purification of recombinant human interferon gamma from fermentation broth using reverse micellar extraction: A process optimization study. *Separation Science and Technology (Philadelphia)*, 53(3), 487–495. <https://doi.org/10.1080/01496395.2017.1395463>
- Pandey, R., & Veeranki, V. (2018). Optimizing secretory expression of recombinant human interferon gamma from Kluyveromyces lactis. In *Preparative Biochemistry and Biotechnology* (Vol. 48, Issue 2). <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1425706>
- Pandey, S., Kawai, T., & Akira, S. (2015). Microbial sensing by toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(1), a016246. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016246>
- Pasche, N., & Neri, D. (2012). Immunocytokines: a novel class of potent armed antibodies. *Drug Discovery Today*, 17(11–12), 583–590. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.01.007>

- Pestka, S., Krause, C. D., & Walter, M. R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological Reviews*, *202*, 8–32.
<https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00204.x>
- Petretto, A., Carbotti, G., Inglese, E., Lavarello, C., Pistillo, M. P., Rigo, V., Croce, M., Longo, L., Martini, S., Vacca, P., Ferrini, S., & Fabbi, M. (2016). Proteomic analysis uncovers common effects of IFN- γ and IL-27 on the HLA class I antigen presentation machinery in human cancer cells. *Oncotarget*, *7*(45), 72518–72536.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.12235>
- Prabhu, A. A., Bharali, B., Singh, A. K., Allaka, M., Sukumar, P., & Veeranki, V. D. (2018). Engineering folding mechanism through Hsp70 and Hsp40 chaperones for enhancing the production of recombinant human interferon gamma (rhIFN- Γ) in *Pichia pastoris* cell factory. In *Chemical Engineering Science* (Vol. 181, pp. 58–67). <https://doi.org/10.1016/j.ces.2018.02.003>
- Prabhu, A. A., Purkayastha, A., Mandal, B., Kumar, J. P., Mandal, B. B., & Veeranki, V. D. (2018). A novel reverse micellar purification strategy for histidine tagged human interferon gamma (hIFN- γ) protein from *Pichia pastoris*. *International Journal of Biological Macromolecules*, *107*, 2512–2524.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.130>
- Prabhu, A. A., Veeranki, V. D., & Dsilva, S. J. (2016). Improving the production of human interferon gamma (hIFN- γ) in *Pichia pastoris* cell factory: An approach of cell level. *Process Biochemistry*, *51*(6), 709–718.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.02.007>
- Prucha, M., Grombirikova, H., Zdrahal, P., Bloomfield, M., Parackova, Z., & Freiberger,

- T. (2020). Mendelian Susceptibility to Mycobacterial Disease: The First Case of a Diagnosed Adult Patient in the Czech Republic. *Case Reports in Immunology*, 2020, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2020/8836685>
- Puetz, J., & Wurm, F. M. (2019). Recombinant Proteins for Industrial versus Pharmaceutical Purposes: A Review of Process and Pricing. *Processes*, 7(8), 476. <https://doi.org/10.3390/pr7080476>
- Radke, J. B., Carey, K. L., Shaw, S., Metkar, S. R., Mulrooney, C., Gale, J. P., Bittker, J. A., Hilgraf, R., Comer, E., Schreiber, S. L., Virgin, H. W., Perez, J. R., & Sibley, L. D. (2018). High Throughput Screen Identifies Interferon γ -Dependent Inhibitors of *Toxoplasma gondii* Growth. *ACS Infectious Diseases*, 4(10), 1499–1507. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.8b00135>
- Raran-Kurussi, S., & Waugh, D. S. (2017). Expression and Purification of Recombinant Proteins in *Escherichia coli* with a His6 or Dual His6-MBP Tag. *Protein Crystallography*, 1607, 15. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7000-1_1
- Razaghi, A., Owens, L., & Heimann, K. (2016). Review of the recombinant human interferon gamma as an immunotherapeutic: Impacts of production platforms and glycosylation. *Journal of Biotechnology*, 240, 48–60. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.10.022>
- Razaghi, A., Tan, E., Lua, L. H. L., Owens, L., Karthikeyan, O. P., & Heimann, K. (2017). Is *Pichia pastoris* a realistic platform for industrial production of recombinant human interferon gamma? *Biologicals*, 45, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.09.015>

- Razaghi, A., Villacrés, C., Jung, V., Mashkour, N., Butler, M., Owens, L., & Heimann, K. (2017). Improved therapeutic efficacy of mammalian expressed-recombinant interferon gamma against ovarian cancer cells. *Experimental Cell Research*, 359(1), 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.08.014>
- Riss, T., Moravec, R., Niles, A., Duellman, S., Benink, H., Worzella, T., & Minor, L. (2013). Cell Viability Assays. In S. Markossian, A. Grossman, & K. Brimacombe (Eds.), *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
- Rocco, G. Di, Baldari, S., Gentile, A., Capogrossi, M., & Toietta, G. (2018). Protein disulfide isomerase as a prosurvival factor in cell therapy for muscular and vascular diseases. *Stem Cell Research & Therapy* 2018 , 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/S13287-018-0986-Y>
- Rönblom, L., & Leonard, D. (2019). Interferon pathway in SLE: one key to unlocking the mystery of the disease. *Lupus Science & Medicine*, 6, 270. <https://doi.org/10.1136/lupus-2018-000270>
- Rosano, G., & Ceccarelli, E. (2014). Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5, 172. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2014.00172>
- Rožman, P., & Švajger, U. (2018). The tolerogenic role of IFN- γ . *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 41, 40–53. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2018.04.001>
- Schellekens, H., & Casadevall, N. (2004). Immunogenicity of recombinant human

proteins: causes and consequences. *Journal of Neurology*, 251(S2).

<https://doi.org/10.1007/s00415-004-1202-9>

Schoberer, J., & Strasser, R. (2018). Plant glyco-biotechnology. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 80, pp. 133–141). Elsevier Ltd.

<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.07.005>

Schoggins, J. W. (2018). Recent advances in antiviral interferon-stimulated gene biology. *F1000Research*, 7, 309.

<https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.12450.1>

Schoggins, J. W. (2019). Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? *Annual Review of Virology*, 6(1), 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*, 1(6), 525.

<https://doi.org/10.1016/J.COVIRO.2011.10.008>

Schwarz, H., Schmittner, M., Duschl, A., & Horejs-Hoeck, J. (2014). Residual Endotoxin

Contaminations in Recombinant Proteins Are Sufficient to Activate Human

CD1c+ Dendritic Cells. *PLoS ONE*, 9(12), e113840.

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0113840>

Secombes, C. J., & Zou, J. (2017). Evolution of interferons and interferon receptors.

Frontiers in Immunology, 8, 209. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00209>

Seif, F., Khoshmirsafa, M., Aazami, H., Mohsenzadegan, M., Sedighi, G., & Bahar, M.

(2017). The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of

T helper cells. *Cell Communication and Signaling* , 15(1), 1–13.

<https://doi.org/10.1186/S12964-017-0177-Y>

Shao, S., Tsoi, L. C., Sarkar, M. K., Xing, X., Xue, K., Uppala, R., Berthier, C. C., Zeng, C., Patrick, M., Billi, A. C., Fullmer, J., Beamer, M. A., Perez-White, B., Getsios, S., Schuler, A., Voorhees, J. J., Choi, S., Harms, P., Kahlenberg, J. M., & Gudjonsson, J. E. (2019). IFN- γ enhances cell-mediated cytotoxicity against keratinocytes via JAK2/STAT1 in lichen planus. *Science Translational Medicine*, 11(511), eaav7561. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aav7561>

Soares, A., Gomes, L., & Mergulhão, F. (2018). Comparing the Recombinant Protein Production Potential of Planktonic and Biofilm Cells. *Microorganisms*, 6(2), 48. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6020048>

Sun, N., Li, C., Li, X. F., Deng, Y. Q., Jiang, T., Zhang, N. N., Zu, S., Zhang, R. R., Li, L., Chen, X., Liu, P., Gold, S., Lu, N., Du, P., Wang, J., Qin, C. F., & Cheng, G. (2020). Type-IIInterferon-Inducible SERTAD3 Inhibits Influenza A Virus Replication by Blocking the Assembly of Viral RNA Polymerase Complex. *Cell Reports*, 33(5), 108342. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108342>

Syedbasha, M., & Egli, A. (2017). Interferon Lambda: Modulating immunity in infectious diseases. *Frontiers in Immunology*, 8, 119. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00119>

Tang, M., Tian, L., Luo, G., & Yu, X. (2018). Interferon-gamma-mediated osteoimmunology. *Frontiers in Immunology*, 9, 1508. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01508>

- Tawfik, G. M., Dila, K. A. S., Mohamed, M. Y. F., Tam, D. N. H., Kien, N. D., Ahmed, A. M., & Huy, N. T. (2019). A step by step guide for conducting a systematic review and meta-analysis with simulation data. *Tropical Medicine and Health*, *47*(46), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s41182-019-0165-6>
- Tembhre, M. K., Parihar, A. S., Sharma, V. K., Imran, S., Bhari, N., Lakshmy, R., & Bhalla, A. (2021). Enhanced expression of angiotensin-converting enzyme 2 in psoriatic skin and its upregulation in keratinocytes by interferon- γ : implication of inflammatory milieu in skin tropism of SARS-CoV-2. *British Journal of Dermatology*, *184*(3), 577–579. <https://doi.org/10.1111/bjd.19670>
- Teranishi, S., Kobayashi, N., Katakura, S., Kamimaki, C., Kubo, S., Shibata, Y., Yamamoto, M., Kudo, M., Piao, H., & Kaneko, T. (2020). Class A CpG oligodeoxynucleotide inhibits IFN- γ -induced signaling and apoptosis in lung cancer. *Thoracic Cancer*, *11*(4), 983–992. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.13351>
- Thak, E. J., Yoo, S. J., Moon, H. Y., & Kang, H. A. (2020). Yeast synthetic biology for designed cell factories producing secretory recombinant proteins. *FEMS Yeast Research*, *20*(2), 9. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foaa009>
- Tripathi, N., & Shrivastava, A. (2019). Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *7*, 420. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00420>
- Tschofen, M., Knopp, D., Hood, E., & Stöger, E. (2016). Plant Molecular Farming: Much More than Medicines. *Annual Review of Analytical Chemistry*, *9*(1), 271–294.

<https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-071015-041706>

- Vasuthasawat, A., Yamada, R. E., Trinh, K. R., Rokni, N., Morrison, S. L., & Timmerman, J. (2019). In Vivo Efficacy of Anti-CD20-Interferon-Gamma Fusion Protein Against Syngeneic B Cell Lymphoma Is Mediated By Natural Killer Cells. *Blood*, *134*, 1575–1575. <https://doi.org/10.1182/blood-2019-131890>
- Verthelyi, D., & Wang, V. (2010). Trace Levels of Innate Immune Response Modulating Impurities (IIRMI) Synergize to Break Tolerance to Therapeutic Proteins. *PLoS ONE*, *5*(12), e15252. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015252>
- Vieira, A., Souza, T., Silva, L., Mendonça, F., & Parachin, N. (2018). Comparison of Yeasts as Hosts for Recombinant Protein Production. *Microorganisms*, *6*(2), 38. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6020038>
- Vink, T., Oudshoorn-Dickmann, M., Roza, M., Reitsma, J., & de Jong, R. (2014). A simple, robust and highly efficient transient expression system for producing antibodies. *Methods*, *65*(1), 5–10. <https://doi.org/10.1016/J.YMETH.2013.07.018>
- Wall, L., Burke, F., Barton, C., Smyth, J., & Balkwill, F. (2003). IFN-gamma induces apoptosis in ovarian cancer cells in vivo and in vitro. *Clinical Cancer Research*, *9*(7), 2487–2496. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12855622/>
- Wang, F., Zhang, S., Jeon, R., Vuckovic, I., Jiang, X., Lerman, A., Folmes, C. D., Dzeja, P. D., & Herrmann, J. (2018). Interferon Gamma Induces Reversible Metabolic Reprogramming of M1 Macrophages to Sustain Cell Viability and Pro-Inflammatory Activity. *EBioMedicine*, *30*, 303–316. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.02.009>

- Wang, X., Ashhurst, A. S., Dowman, L. J., Watson, E. E., Li, H. Y., Fairbanks, A. J., Larance, M., Kwan, A., & Payne, R. J. (2020). Total synthesis of glycosylated human interferon- γ . *Organic Letters*, 22(17), 6863–6867.
<https://doi.org/10.1021/acs.orglett.0c02401>
- Wang, Y., Liu, D., Crowell, L., Love, K., Wu, S., & Hancock, W. (2019). The application of HPLC/MS analysis with a multi-enzyme digest strategy to characterize different interferon product variants produced from *Pichia pastoris*. *Amino Acids*, 51(9), 1353–1363. <https://doi.org/10.1007/s00726-019-02772-9>
- Weiner, C., & Buhimschi, C. (2009). I. In C. Weiner & C. Buhimschi (Eds.), *Drugs for Pregnant and Lactating Women* (2nd ed., pp. 490–550). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-4013-2.00009-0>
- Wells, A. I., & Coyne, C. (2018). Type III Interferons in Antiviral Defenses at Barrier Surfaces. *Trends in Immunology*, 39(10), 848–858.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2018.08.008>
- Wu, J., Wang, W. F., Zhang, Y. D., & Chen, T. X. (2017). Clinical Features and Genetic Analysis of 48 Patients with Chronic Granulomatous Disease in a Single Center Study from Shanghai, China (2005-2015): New Studies and a Literature Review. *Journal of Immunology Research*, 8745254.
<https://doi.org/10.1155/2017/8745254>
- Wu, S., Liu, X., Wang, Y., Zhang, M., Wang, M., & He, J. Q. (2019). Genetic polymorphisms of ifng and ifngr1 with latent tuberculosis infection. *Disease Markers*, 2019, 8410290. <https://doi.org/10.1155/2019/8410290>

- Yao, J., Weng, Y., Dickey, A., & Wang, K. (2015). Plants as factories for human pharmaceuticals: Applications and challenges. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(12), 28549–28565. <https://doi.org/10.3390/ijms161226122>
- Yetkin, M. F., & Gültekin, M. (2020). Efficacy and tolerability of interferon gamma in treatment of friedreich's ataxia: Retrospective study. *Noropsikiyatri Arsivi*, *57*(4), 270–273. <https://doi.org/10.29399/npa.25047>
- Yoon, W., Park, Y. C., Kim, J., Chae, Y. S., Byeon, J. H., Min, S. H., Park, S., Yoo, Y., Park, Y. K., & Kim, B. M. (2017). Application of genetically engineered *Salmonella typhimurium* for interferon-gamma-induced therapy against melanoma. *European Journal of Cancer*, *70*, 48–61. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.10.010>
- Zanoni, I., Granucci, F., & Broggi, A. (2017). Interferon (IFN)- λ takes the helm: Immunomodulatory roles of type III IFNs. *Frontiers in Immunology*, *8*, 1661. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01661>
- Zhang, N., Dolan, M., Wu, D., Phillips, G. C., & Xu, J. (2016). Dramatic secretion of recombinant protein expressed in tobacco cells with a designer glycopeptide tag is highly impacted by medium composition. *Plant Cell Reports*, *35*(12), 2513–2522. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2051-6>
- Zhang, N., Wright, T., Caraway, P., & Xu, J. (2019). Enhanced secretion of human α 1-antitrypsin expressed with a novel glycosylation module in tobacco BY-2 cell culture. *Bioengineered*, *10*(1), 87–97. <https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1604037>

- Zhang, P., Woen, S., Wang, T., Liau, B., Zhao, S., Chen, C., Yang, Y., Song, Z., Wormald, M. R., Yu, C., & Rudd, P. M. (2016). Challenges of glycosylation analysis and control: An integrated approach to producing optimal and consistent therapeutic drugs. *Drug Discovery Today*, *21*(5), 740–765. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.01.006>
- Zhang, Q., Wang, C., Ma, F., Yao, L., Gao, H., Zhu, L., & Zheng, L. (2020). Development and biological activity of long-acting recombinant human interferon- α b. *BMC Biotechnology*, *20*(16), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12896-020-00605-2>
- Zhao, T., Li, Y., Zhang, J., & Zhang, B. (2020). PD-L1 expression increased by ifn- γ via jak2-stat1 signaling and predicts a poor survival in colorectal cancer. *Oncology Letters*, *20*(2), 1127–1134. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11647>
- Zhu, F., Wang, Q., Pu, H., Gu, S., Luo, L., & Yin, Z. (2013). Optimization of soluble human interferon- γ production in *Escherichia coli* using SUMO fusion partner. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, *29*(2), 319–325. <https://doi.org/10.1007/S11274-012-1185-0>
- Zuber, B., Rudström, K., Ehrnfelt, C., & Ahlborg, N. (2016). Epitope Mapping of Neutralizing Monoclonal Antibodies to Human Interferon- γ Using Human-Bovine Interferon- γ Chimeras. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, *36*(9), 542–551. <https://doi.org/10.1089/jir.2016.0017>

