

PRODUCCIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVAS VARIANTES HIPERGLICOSILADAS DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE

Dorella, Aquiles¹

¹*Laboratorio de Cultivos Celulares- Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas UNL*

Áreas: Ciencias Biológicas y Ciencias de la Salud

Sub-Área: Biotecnología y Medicina

Grupo: X

Palabras clave: Eritropoyetina, Cromatografía, Glicoingeniería

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la producción de bioterapéuticos ha adquirido gran relevancia frente a las drogas sintéticas. Los mismos son producidos en sistemas biológicos y presentan diferencias importantes en cuanto a su tamaño, estructura, potencia biológica, farmacocinética y farmacodinamia.

La eritropoyetina (EPO) es una glicoproteína que forma parte de las citoquinas tipo I y se caracteriza por su importante actividad pleiotrópica. Es uno de los principales reguladores de la eritropoyesis y actúa sinérgicamente con otras moléculas para promover la proliferación, diferenciación y supervivencia de los progenitores celulares de linajes eritroides y mantener la masa de eritrocitos circulantes. Por tal motivo, la EPO, como bioterapéutico, es ampliamente utilizada para el tratamiento de la anemia provocada por la insuficiencia renal crónica. Asimismo, desarrolla múltiples funciones: citoprotección, vasculogénesis y angiogénesis [Brines y col., 2006; Arcasoy, 2010].

La EPO humana (hEPO) está compuesta por una cadena de 166 aminoácidos con una masa molecular aproximada de 30400 Da. Presenta un sitio de O-glicosilación (Ser126) y tres de N-glicosilación (Asn24, Asn38 y Asn83) [Krantz y col., 1991]. Estos glicanos presentan un rol fundamental a nivel de la actividad biológica de la molécula, considerando su tiempo de vida media en circulación y su unión al receptor.

El empleo de diversas técnicas de ingeniería genética ha permitido el desarrollo de variantes similares a la hEPO, con mayor grado de glicosilación, con el objetivo de incrementar su vida media en plasma. Esto se traduce en una reducción del número de dosis en el tratamiento de la anemia.

Por otra parte, en la producción de bioterapéuticos, la purificación de las moléculas es una etapa crítica. Desarrollar estrategias que permitan obtener la molécula con un alto grado de pureza en pocos pasos de purificación, permitirá diseñar un proceso de producción que cumpla con los atributos de calidad exigidos.

OBJETIVOS

- Generar variantes de EPO que presenten un grado de glicosilación superior con el propósito de aumentar su vida media plasmática para el tratamiento o prevención de la anemia provocada por insuficiencia renal crónica.
- Desarrollar líneas celulares productoras de las variantes hiperglicosiladas de rhEPO.

Proyecto: PRODUCCIÓN, PURIFICACION Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVAS VARIANTES HIPERGLICOSILADAS DE ERITROPOYETINA HUMANA RECOMBINANTE

Director del proyecto: Oggero Marcos Rafael

Director del becario/tesista: Bürgi María de los Milagros

- Identificar un método de purificación para aislar la proteína de interés del sobrenadante de cultivo con un alto grado de pureza.

METODOLOGÍA

Desarrollo de líneas celulares productoras de variantes de rhEPO

Las variantes de rhEPO se generaron mediante la introducción de un sitio adicional y potencial para N-glicosilación sobre la secuencia aminoacídica de la molécula, empleando mutagénesis sitio dirigida mediante PCR. Se generaron dos muteínas cuyos productos de PCR se clonaron en el vector pLV-PLK para generar así los vectores pLV-PLK-mutA y pLV-PLK-mutB. Los mismos fueron secuenciados para asegurar la incorporación de la mutación puntual.

Posteriormente, utilizando dichos vectores, se ensamblaron partículas lentivirales (PLV) para cada variante de hEPO en células HEK 293T/17. Luego de 48 h, se cosecharon los sobrenadantes de cultivo conteniendo PLV-mutA y PLV-mutB, con las cuales se produjeron, mediante transducción, dos líneas celulares recombinantes de células CHO-K1.

Producción de las muteínas de EPO

Las células CHO-K1 fueron cultivadas en frascos triples con medio de cultivo DMEM/HAM's F12 suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10% (v/v) y L-Glutamina 2 mM. Una vez alcanzada la confluencia, la producción de las muteínas se realizó con el mencionado medio pero conteniendo SFB al 0,5% (v/v).

Los sobrenadantes de cultivo de ambas líneas celulares se cosecharon cada 48 h, durante 16 días, conservándose a -20 °C hasta su procesamiento. La determinación de la concentración de las muteínas se llevó a cabo mediante ELISA sándwich.

Evaluación de la capacidad eluyente de diferentes soluciones

Con el propósito de evaluar la capacidad de diferentes soluciones para desorber cada muteína de rhEPO retenida por el anticuerpo monoclonal anti-rhEPO (mAb) 2B2, obtenido previamente en nuestro laboratorio [Amadeo y col., 2004], se llevó a cabo un ensayo de ELISA sándwich como prototipo de simulación de un procedimiento de captura por cromatografía de inmutafinidad. Se realizaron dos protocolos: en el protocolo A se inmutafilizó el mAb 2B2, luego se bloqueó con leche descremada disuelta al 2% (p/v) en solución salina de fosfatos (PBS) y se sembraron las muteínas en concentración constante. Luego, se realizó la incubación con distintos soluciones imitando el proceso de elución cromatográfica. Finalmente, se midió la presencia de la muteína retenida en la placa, postratamiento.

El protocolo B se realizó como control de la capacidad del anticuerpo para preservar sus características de unión luego de ser tratado con la correspondiente solución eluyente. Por lo tanto, las muteínas fueron agregadas luego de tratar el anticuerpo unido a la placa, con las distintas soluciones. Seguidamente, se determinó la presencia de la muteína que era capaz de ser aún captada por el anticuerpo. Para ambos protocolos, se procedió al agregado de anticuerpos policlonales anti-rhEPO obtenidos en conejo. Finalmente, se adicionaron anticuerpos de cabra anti-inmutoglobulinas de conejo conjugados con la enzima peroxidasa. La presencia de la enzima fue determinada mediante reacción colorimétrica empleando como sustrato agua oxigenada al 10% (v/v) en fosfato/citrato pH 5,4 y o-fenilendiamina 0,5 mg/mL.

Cromatografía de Inmutafinidad (CIA)

Previamente al procesamiento de las muestras mediante cromatografía de inmutafinidad, las cosechas de ambas muteínas de hEPO fueron filtradas con filtros

de membrana de acetato de celulosa Sartorius® de 0,45µm.

Para la CIA, se utilizó una resina preparada en base a una matriz de *Sepharose FF* previamente activada con CNBr en la cual se inmovilizó el mAb anti-rhEPO 2B2. Se sembró el sobrenadante clarificado en la columna previamente equilibrada con Tritón X-100 0,3% (v/v) diluido en solución de Tris-HCl 25 mM pH 7,5. La siembra se realizó a flujo constante. Luego de los lavados con las siguientes soluciones (Tritón X-100 0,2% (v/v), NaCl 0,5 M, Tris-HCl 25 mM pH 7,5; Tritón X-100 0,1% (v/v), NaSCN 1 M, Tris-HCl 25 mM pH 7,5; NaCl 0,15 M, AcNa 25 mM pH 5,0) empleando un flujo constante de 0,5 mL/min. La etapa de elución se realizó utilizando solución de ácido acético 0,2 M; NaCl 0,15 M; pH 3 o glicina 0,15 M pH 2,5. El eluato se recolectó en fracciones que fueron neutralizadas con el volumen adecuado de Tris-HCl 1M pH 8.

Caracterización de las muteínas de rhEPO mediante isoelectroenfoque

Se preparó un gel de poliacrilamida 8% (p/v) conteniendo urea 7M y una mezcla de anfólitos de pH 3-5 y de pH 5-7 en una cuba de electroforesis. El gel fue preenfocado a 30W, 250V, 50mA durante 30 min. Luego se sembraron las muestras y se enfocaron las mismas durante 90 min. Las muestras fueron transferidas a una membrana de PVDF y luego detectadas mediante el empleo de anticuerpos policlonales de conejo anti-rhEPO desarrollados previamente en nuestro laboratorio. Seguidamente, la membrana fue incubada con anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo conjugados a peroxidasa. Finalmente, la presencia de la enzima se reveló empleando reactivos quimioluminiscentes.

RESULTADOS

Se construyeron las variantes de hEPO, se ensamblaron PLVs de cada muteína y se generaron líneas CHO.K1 productoras de mutA y mutB. Los sobrenadantes fueron recolectados y conservados.

Posteriormente, con el objetivo de identificar una solución con capacidad para desorber las muteínas de hEPO capturadas por el mAb 2B2, se estudió el comportamiento de distintas soluciones mediante ELISA sándwich. Se identificaron tres soluciones con mayor poder elutorio: glicina 0,1 M pH 2; glicina 0,15 M pH 2,5 y ácido acético 0,2 M/NaCl 0,15 M pH 3. Si bien la primera de éstas mostró el mayor poder eluyente (Figura 1, protocolo A), se observó que la misma afectaba al anticuerpo, impidiendo su unión posterior a las muteínas de hEPO (Figura 1, protocolo B). Por este motivo, la solución de glicina 0,1 M pH 2 fue desestimada. Las otras dos soluciones mostraron un poder eluyente superior con respecto a las restantes, sin alterar la capacidad de unión con el mAb 2B2 luego de ser tratado con la misma solución.

1. Glicina 0,1 M pH 2
2. Glicina 0,15 M pH 2,5
3. Glicina 0,15 M pH 3
4. Ac. cítrico/citrato 0,1 M pH 3
5. Ácido acético 0,2 M, NaCl 0,15 M pH 3
6. Glicina 0,15 M pH 3,5
7. Acetato de sodio 0,1 M pH 4
8. Acetato de sodio 0,1 M / Dioxano 10% (v/v) pH 4
9. Acetato de sodio 0,1 M pH 5
10. Fosfato de sodio 0,1 M pH 6
11. Isopropanol 40% (v/v) en PBS pH 7
12. PBS pH 7
13. Etanol 40% (v/v) en PBS pH 7
14. Dioxano 10% (v/v) en PBS pH 7
15. Etilenglicol 40% (v/v) en PBS pH 7
16. Tris-HCl 0,1 M pH 8
17. Glicina 0,1 M pH 9
18. Glicina 0,1 M pH 10
19. Glicina 0,1 M pH 11
20. Fosfato de sodio 0,1 M pH 11
21. Fosfato de sodio 0,1 M pH 11,7

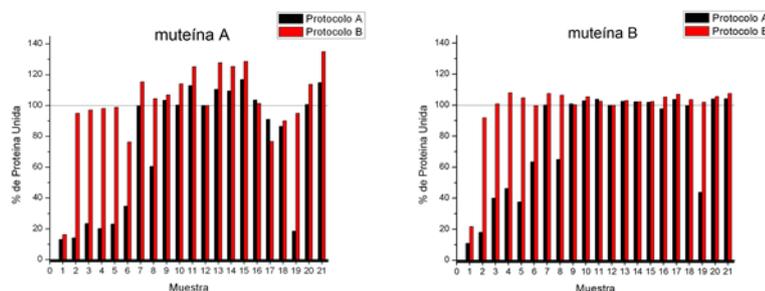


Figura 1: Estudio de la capacidad eluyente de distintas soluciones mediante ELISA sándwich.

Luego de seleccionar las soluciones para llevar a cabo el procedimiento de elución de la matriz de IA, se procedió a la purificación de ambas muteínas en condiciones dinámicas.

Los resultados de cada uno de los protocolos de elución seleccionados se resumen en

la Tabla 1, en la cual se muestran los porcentajes de recuperación de las muteínas durante cada etapa.

Protocolo cromatográfico	mutEPO	FT	Lavado1	Lavado 2	Lavado 3	Elución
Elución pH 3	A	16	19	0	0	49
	B	43	26	0	0	19
Elución pH 2,5	A	8	11	0	0	34
	B	10	27	0	0	54

Tabla 1: Recuperación porcentual de mut-EPO (A o B) en cada etapa de la CIA, empleando como eluyente ácido acético 0,2 M NaCl 0,15 M pH 3 o glicina 0,15 M pH 2,5.

Las recuperaciones obtenidas fueron variables dependiendo de la muteína y la condición eluyente. Es posible concluir que la CIA con elución a pH 3 rindió una mayor recuperación de la mutA con respecto al protocolo a pH 2,5. Contrariamente, para la mutB se obtuvo un rendimiento superior mediante este último protocolo.

Con el objetivo de evaluar las glicofomas de cada variante de rhEPO recuperadas luego de la CIA, se llevó a cabo el procedimiento de IEF. La Figura 2 permite observar que ambas muteínas presentan mayor contenido de isoformas más ácidas con respecto rhEPO no modificada y que luego de la CIA, las isoformas se conservan o aparecen otras que no podían visualizarse en el sobrenadante debido a su baja concentración.

Por otra parte, mediante *Western Blot* (no mostrado), se pudo corroborar que ambas muteínas presentan una masa molecular superior a EPO wt y junto con el IEF reflejan un grado superior de glicosilación.

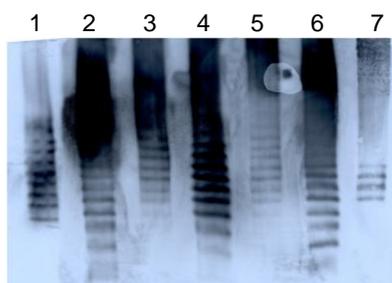


Figura 2: IEF de las variantes de EPO producidas. Las muestras sembradas fueron: sobrenadante (SN) de cultivo de mut A (1), CIA-Elución a pH 3 de mut A (2), CIA-Elución a pH 2,5 de mut A (3), SN de cultivo de mut B (4), CIA-Elución a pH 3 de mut B (5), CIA-Elución a pH 2,5 de mut B (6), EPO wt comercial (7).

En conclusión, las variantes de hEPO presentan superior grado de glicosilación y evidencian propiedades fisicoquímicas que diferencian su capacidad de adsorción/desorción en la CIA ensayada para su purificación. Cabe destacar, que los resultados aquí mostrados son sólo una parte del proyecto que contempla la generación de variantes hiperglicosiladas, y por tanto, se prevé realizar ensayos que permitan estudiar la actividad eritropoyética de cada muteína, así como su caracterización. No obstante, es imprescindible disponer de las variantes puras para realizar dichos ensayos, jugando un rol importante los resultados mostrados en el presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- **Krantz SB.** (1991). Erythropoietin. *Blood*, 77, 419-434.
- **M. Brines, A. Cerami** (2006). Discovering erythropoietin's extra-hematopoietic functions: biology and clinical promise, *Kidney Int.* 70 246-250.
- **Arcasoy MO** (2010) Non-erythroid effects of erythropoietin. *Haematologica* 95 (11) 1803-1805
- **Mattio M, Ceaglio N, Oggero M, Perotti N, Amadeo I, Orozco G, Forno G, Kratje R, Etcheverrigaray M.** (2011) Isolation and characterization of a subset of erythropoietin glycoforms with cytoprotective but minimal erythropoietic activity. *Biotechnol Prog.*, 27(4), 1018-1028.
- **Amadeo I, Oggero M, Zenclussen ML, Etcheverrigaray M** (2004) A single monoclonal antibody as probe to detect the entire set of native and partially unfolded rhEPOglycoforms. *J Immunol Methods* 293(1-2):191-205.